

**STUDI TOKSISITAS KOMBINASI KURKUMIN DAN VITAMIN E
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR
DAN KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)
PADA HEWAN COBA TIKUS
(*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Oleh :
Mufid Hadi Raharjo
115130107111032



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**STUDI TOKSISITAS KOMBINASI KURKUMIN DAN VITAMIN E
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR
DAN KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)
PADA HEWAN COBA TIKUS
(*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh

MUFID HADI RAHARJO

115130107111032



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI TOKSISITAS KOMBINASI KURKUMIN DAN VITAMIN E
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR
DAN KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)
PADA HEWAN COBA TIKUS
(*Rattus norvegicus*)**

Oleh:

MUFID HADI RAHARJO

115130107111032

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada Tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Dra. Herawati, MP

NIP. 19580127 198503 2 001

drh. Dyah Ayu O., M.Biotech

NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mufid Hadi Raharjo

NIM : 115130107111032

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Studi Toksisitas Kombinasi Kurkumin Dan Vitamin E Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Dan Kadar Malondialdehida (MDA) Pada Hewan Coba Tikus (*Rattus Norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang.

Yang menyatakan,

(Mufid Hadi Raharjo)

NIM. 115130107111032

**Studi Toksisitas Kombinasi Kurkumin Dan Vitamin E Terhadap Gambaran
Histopatologi Hepar Dan Kadar Malondialdehida (MDA)
Pada Hewan Coba Tikus (*Rattus Norvegicus*)**

ABSTRAK

Hepar adalah organ yang berfungsi untuk menetralkan zat toksik dalam tubuh. Radikal bebas merupakan molekul reaktif yang dapat menyebabkan kerusakan sel di tubuh. Antioksidan di dalam tubuh berfungsi untuk mengurangi kemampuan merusak sel oleh radikal bebas. Konsentrasi yang tidak seimbang antara radikal bebas dengan antioksidan dalam tubuh memicu stres oksidatif dan kerusakan sel. Kombinasi kurkumin dan vitamin E jika diberikan dengan dosis yg tinggi dan jangka waktu lama maka akan menimbulkan efek toksik pada hepar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat efek toksik dari terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E ditinjau dari kadar MDA dan histopatologi hepar pada tikus (*Rattus norvegicus*). Kurkumin dan vitamin E ditambahkan CmCna lalu dilarutkan dengan larutan NaCl kemudian dilakukan terapi dengan cara per oral menggunakan sonde selama 28 hari. Penelitian dilakukan dengan membagi tikus jantan dan betina menjadi 4 kelompok yakni kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, kelompok jantan dan betina terapi 14 hari serta kelompok jantan dan betina terapi kombinasi kurkumin selama 28 hari dengan dosis sebanyak 72 mg/kg BB dan vitamin E sebanyak 200IU satu kali sehari. Kadar MDA diukur menggunakan metode *Thiobarbaturic Acid* (TBA) dan histopatologi hepar dengan metode pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*). Hasil penelitian dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji BNJ dengan $\alpha = 0,5\%$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari dapat menurunkan kadar MDA. Dosis 72 mg/kg BB terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari merupakan dosis optimum yang dapat menurunkan kadar MDA dan tidak menimbulkan efek toksik dengan melihat gambaran histopatologi hepar pada tikus. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terapi kombinasi kurkumin selama 14 hari dapat menurunkan kadar MDA sebesar 90,6% dan merupakan dosis yang tepat dengan melihat gambaran histopatologi hepar tikus.

Kata Kunci : Antioksidan, Histopatologi Hepar, Kurkumin, MDA, *Rattus norvegicus*, Vitamin E

Study of Toxicity Combination Curcumin And Vitamin E Toward The Liver Histopathology And Malondialdehyde (MDA) On Rat (*Rattus Norvegicus*)

ABSTRACT

Liver is an organ that serves to neutralize toxic substances in the body. Free radicals are reactive molecules that can cause cellular damage in the body. Antioxidants in the body to reduce the ability to damage cells by free radicals. The unbalanced concentration between free radicals and antioxidants in the body triggers oxidative stress and cellular damage. Combination of curcumin and vitamin E if given with high doses and long period of time it will cause toxic effects on the liver. This study aims to determine whether there are toxic effects of combination therapy curcumin and vitamin E in terms of MDA and liver histopathology on rat (*Rattus norvegicus*). Curcumin and vitamin E added CmCna then dissolved with NaCl solution then performed therapy by mouth orally using sonde for 28 days. The study was conducted by dividing male and female rats into 4 groups positive control group, negative control group, male group and female therapy 14 days and group of male and female combination of curcumin for 28 days with dose as much as 72 mg /rat and vitamin E as much 200IU once a day. MDA levels were measured using Thiobarbaturic Acid (TBA) and hepatic histopathology with HE (Hematoxylin Eosin) staining method. The results were analyzed by ANOVA and continued with BNJ test with $\alpha = 0,5\%$. The results showed that combination of curcumin and vitamin E therapy for 14 days can decrease MDA levels. A dose of 72 mg /rat of combination therapy for curcumin and vitamin E for 14 days is the optimum dose that can decrease MDA levels and does not cause toxic effects by looking at the histopathologic features of the liver in rat. The conclusion of this research is combination of curcumin therapy for 14 days can decrease MDA level equal to 90,6% and is the right dose by looking at histopathology picture of liver of rat.

Keywords: Antioxidant, Liver Histopathology, Kurkumin, MDA, *Rattus norvegicus*, Vitamin E

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga proposal Skripsi yang berjudul “Pengaruh Terapi Kombinasi Kurkumin dan Vitamin E pada Hewan Coba Tikus (*Rattus Norvegicus*) Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar dan Kadar Malondialdehida (MDA)” ini dapat terselesaikan.

Dengan penuh rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan Skripsi ini. Ucapan terimakasih terutama kepada:

1. Dr. Dra. Herawati, MP selaku dosen pembimbing 1 atas segala bantuan, kesempatan, bimbingan, arahan serta dukungan yang diberikan kepada penulis
2. Drh. Dyah Ayu Oktavianie, M.Biotech selaku dosen pembimbing 2 atas segala bantuan, kesempatan, bimbingan, arahan serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
3. Drh. Aulia Firmawati, M.Vet selaku dosen penguji I atas saran, masukan, koreksi serta perbaikan yang diberikan kepada penulis.
4. Drh. Viski Fitri Hendriawan, M.Vet selaku dosen Penguji II atas segala saran, masukan, koreksi dan perbaikan yang diberikan kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.
6. Drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku ketua jurusan Fakultas Kedokteran yang turut serta membantu dan memotivasi saya selama penulisan skripsi ini..

7. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada Kedua Orangtua Tercinta Drs. Stia Kawan Raharjo, MM. dan Nurhasanah serta adik kandung Nazhir, Araaf dan Araafi yang telah memberikan doa, kasih sayang, dukungan moral dan materil kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
8. Resina Herdityas, S.T yang telah sabar menanti, memberikan dukungan, doa, dan semangat kepada penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan skripsi ini.
9. Enni Mufidah, Nicho Pradana, Basri Anshori, Adrian Bagus, Tio Rahadian, Arif Qadri, Arvanto Hour yang telah menjadi keluarga baru selama proses pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan dan menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan.

Penulis menyadari bahwa penulisan Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, maka saran dan kritik yang konstruktif dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Malang.

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Masalah.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Hewan Coba Tikus (<i>Ratus novvergicus</i>).....	6
2.2 Kurkumin.....	7
2.2.1 Aktivitas Biologi Kurkumin.....	8
2.3 Vitamin E.....	11
2.4 Radikal Bebas.....	13
2.5 Hati.....	14
2.6 Malondealdehid (MDA).....	19
2.6.1 Mekanisme Pembentukan MDA.....	21
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN ..	23
3.1 Kerangka Konsep.....	23
3.2 Hipotesa Penelitian.....	25
BAB IV METODE PENELITIAN	26
4.1 Waktu danTempat Penelitian.....	26
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	26
4.3 Rancangan Penelitian.....	27
4.4 Penetapan Sampel Penelitian.....	27
4.5 Pembagian Kelompok Penelitian.....	27
4.6 Variabel Penelitian.....	29
4.7 Tahapan Penelitian	
4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	29
4.7.2 Pemberian Terapi Kurkumin dan Vitamin E.....	30
4.7.3 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	30

4.7.4 Pemeriksaan Malondialdehid (MDA).....	33
4.7.5 Isolasi Protein dan Pengukuran Kadar Malondialdehida.....	34
4.8 Analisis Data.....	35
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
5.1 Pengaruh Terapi Kombinasi Kurkumin Dan Vitamin E Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Jaringan Tikus	36
5.2 Gambaran Histopatologi Organ Hepar Tikus Setelah Diterapi dengan Kombinasi Kurkumin Dan Vitamin E.....	41
BAB VI PENUTUP.....	52
6.1 Kesimpulan.....	52
6.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53
LAMPIRAN.....	58



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian.....	5
5.1 Kadar <i>malondialdehyde</i> (MDA) jaringan hepar tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)..	37



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tikus <i>Rattus novergicus</i>	5
2.2 Kurkumin.....	7
2.3 Histopatologi Hepar.....	19
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	23



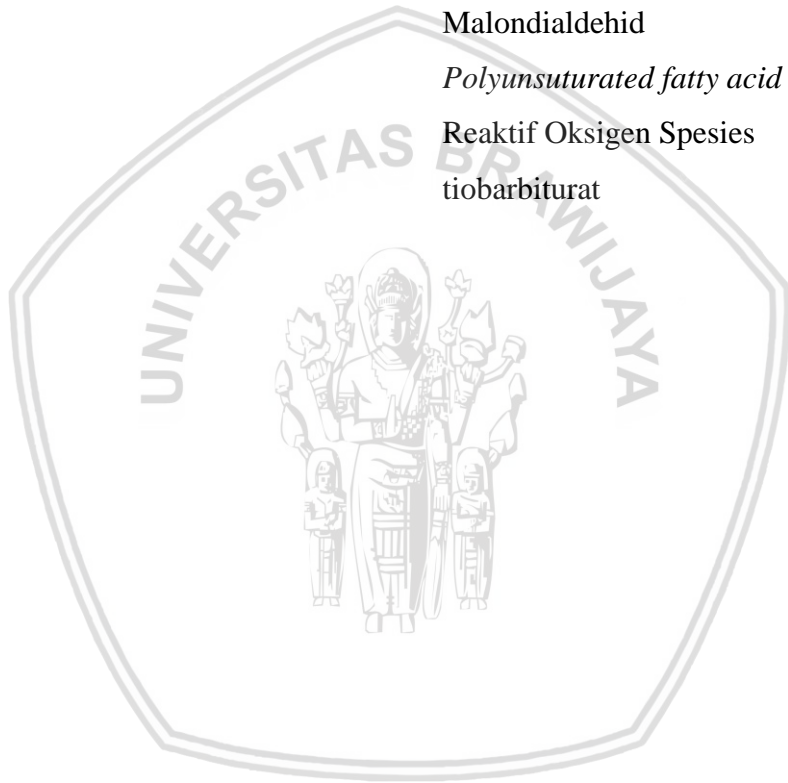
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Kerangka Operasional.....	31
2 Dosis Perhitungan Terapi Ekstrak Kurkumin Vitamin E... ..	32
3 Pembuatan Larutan Kurkumin.....	32
4 Pembuatan Pelarut Kurkumin.....	32
5 Dosis Kurkumin Setiap Tikus.....	33
6 Prosedur Perhitungan Kadar MDA.....	33
7 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	35



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/ Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
CmCNa	Carboxymethyl Cellulose-Sodium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
LDL	Low-Density Lipoprotein
MDA	Malondialdehid
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
ROS	Reaktif Oksigen Spesies
TBA	tiobarbiturat



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Hepar adalah organ yang terpenting dan merupakan suatu organ metabolik yang terbesar di dalam tubuh. Organ ini sangat peka terhadap zat toksik dan memiliki peranan yang penting dalam metabolisme. Hepar memiliki peran dalam banyak proses tubuh, diantaranya memproduksi berbagai protein penting, memproses dan menyimpan nutrisi, metabolisme zat makanan serta sebagian obat dan toksikan. Beberapa faktor dapat menyebabkan terjadinya kerusakan hepar antara lain virus, parasit, bakteri, toksisitas dari obat-obatan atau bahan kimia (Kaplowitz, 2004).

Kurkumin merupakan bagian terbesar pigmen kuning yang terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa L.*) yang memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antioksidan, antiinflamasi, antikolesterol, antiinfeksi, dan antineoplastik (Nurrochmad, 2004). Kurkumin terdokumentasi dengan baik sebagai penghambat proses karsinogenesis juga memacu proses apoptosis yaitu proses alami kematian sel dalam rangka mempertahankan integritas sel secara keseluruhan (Meiyanto, 2000).

Vitamin E merupakan zat gizi yang penting karena memiliki sifat antioksidan sehingga dapat menghambat terjadinya penyakit degeneratif. Peranan vitamin E selain antioksidan juga dapat melindungi membran sel dari peroksidasi lipida. Vitamin E juga memiliki kelebihan lain yaitu

membantu memperlama umur hidup sel-sel darah merah melindungi membran biologis seperti yang berada di jaringan syaraf, otot dan sistem kardiovaskuler serta meningkatkan sistem kekebalan membantu mencegah kehilangan vitamin A karena oksidasi (Dewoto, 2007).

Kelebihan pemberian kurkumin dan vitamin E dapat menyebabkan kerusakan pada hepar yang disebabkan oleh radikal bebas. Pemaparan kurkumin dan vitamin E memerlukan aktivasi metabolisme terutama oleh enzim sitokrom P450 di hepar. Aktivasi tersebut akan menjadikan metabolit yang lebih toksik, sehingga dapat menyebabkan kerusakan hepar pada hewan coba. Pembentukan radikal bebas yang berlebihan akan mengakibatkan stres oksidatif, yang dapat menimbulkan gangguan pada hepar. Stres oksidatif yang berlebihan dalam tubuh dapat diukur melalui kadar malondialdehidaa (MDA) (Grotto, 2009).

Toksisitas yang disebabkan kurkumin dan vitamin E di hepar hewan coba tikus putih dapat menyebabkan nekrosis yaitu perubahan morfologis yang menunjukkan kematian sel dan terjadinya sirosis yaitu tidak efisiensinya fungsi regeneratif sel-sel hepar (Papay, 2009).

Berdasarkan uraian tersebut penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek toksik kurkumin, vitamin E, dan kadar malondialdehidaa (MDA) pada hewan coba tikus yang diterapi dengan ekstrak curcuma dan vitamin E. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut :

1. Apakah pemberian kombinasi kurkumin (*Curcuma longa*) dan vitamin E dapat meningkatkan kadar MDA tikus?
2. Apakah pemberian kombinasi kurkumin (*Curcuma longa*) dan vitamin E berpengaruh terhadap gambaran histopatologi hepar tikus?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dan betina strain *Wistar* yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajah Mada Yogyakarta dengan jumlah 20 ekor dengan perincian jantan 10 ekor dan betina 10 ekor, umur 9-10 minggu dan berat badan 140-150 gram. Penggunaan hewan model dalam penelitian telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 883-KEP-UB.
2. Hewan coba yang dibagi menjadi empat kelompok perlakuan. Kelompok pertama akan diberikan kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari sedangkan kelompok kedua selama 28 hari. Setiap kelompok

perlakuan akan memiliki 2 ekor tikus yang digunakan sebagai kontrol negatif yang terdiri dari tikus jantan dan betina.

3. Dosis kurkumin yang diberikan pada tikus yaitu sebesar 72 mg/kg BB/hari yang dikombinasikan dengan vitamin E 200IU.
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar malondialdehidaa (MDA) yang diukur menggunakan *Thiobarbituric Acid reactivity test* (TBA) dan gambaran histopatologi hepar dgn pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE).

1.4 Tujuan

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1) Untuk mengetahui ekstrak terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E terhadap kadar MDA tikus (*Rattus novergicus*).
- 2) Untuk mengetahui efek toksik dari terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E terhadap gambaran histopatologi hepar tikus (*Rattus novergicus*).

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada mahasiswa dan masyarakat luas bahwa terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E dapat bekerja secara efektif dengan dosis yang tepat sehingga tidak menimbulkan efek toksik atau efek samping dalam jangka waktu tertentu.



norvegicus) yaitu mudah untuk pemberian obat secara oral karena tikus ini tidak memiliki kantung empadu sehingga tidak ada respon muntah (Mangkoewidjojo, 2008). Klasifikasi Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Sub filum : Vertebrata
Klass : Mammalia
Ordo : Rodentia
Familia : Muridae
Sub Familia: Murinae
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus* strain Wistar (Rukmanasari, 2010)

2.2 Kurkumin

Kurkumin adalah konstituen utama pada spesies kurkuma. Senyawa tersebut merupakan diketon simetris yang gugus karbonilnya terkonjugasi oleh cincin feolik (Sudibyo, 2005). Kurkumin adalah fraksi dari kurkuminoid yang mengandung banyak khasiat. Kurkumin dan turunannya merupakan zat aktif yang mempunyai aktifitas biologis berspektrum luas. Serbuk kering rhizome (turmerik) mengandung 3-5% kurkumin dan dua senyawa derivatnya dalam jumlah yang kecil yang ketiganya sering disebut sebagai kurkuminoid. Kurkuminoid tersusun atas 3 macam senyawa, yaitu kurkumin yang merupakan kandungan utamanya, serta demetoksi kurkumin



keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal ke bentuk lebih stabil (Limantara, 2008).

Kurkuminoid telah dikembangkan dalam dunia obat-obatan yang pada umumnya berupa jamu. Kurkuminoid terbukti memiliki berbagai fungsi dan aktifitas sebagai antioksidan, anti-inflamatori, digestif, antibakteri, antimutagenik, antifungi, antiteratogenik dan antikarsinogenik (Cherwae, 2004). Kurkuminoid juga berfungsi mencegah kanker kulit, perut, kolon, prostat, duodenum dan hepar (Majithiya, 2004).

2.2.1 Aktivitas Biologi Kurkumin

Kurkumin 1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6 heptadiena-3,5-dion merupakan senyawa α , β diketon asiklik diaril yang berwujud kristal kuning jingga. Kurkumin memiliki aktivitas biologi yang tinggi meliputi aktivitas antioksidan, aktivitas antikanker, aktivitas antiangiogenesis dan lain-lain. Mekanisme antioksidan pada kurkumin dihubungkan dengan adanya atom H dari gugus fenolik. Sebagai penangkap radikal, kurkumin dapat menjaga integritas membran sel yang diakibatkan peristiwa degradasi oksidatif karena adanya radikal oksigen dan radikal-radikal reaktif lainnya (Sun *et.al.*, 2004).

Kurkumin dilaporkan memiliki beberapa efek farmakologi yaitu sebagai antikanker meliputi penghambatan tumorigenesis, penghambatan proliferasi sel kanker, menghambat aktivitas reseptor faktor pertumbuhan

epidermal, menghambat aterosklerosis dan infark miokardial yakni menurunkan kolesterol serum, menghambat LDL dan menghambat agregasi platelet, menekan diabetes, meningkatkan penyembuhan luka, menekan gejala artritis, hepatoprotektif, immunosupresif, serta antiinflamasi dan antioksidan (Aggarwal *et al.*, 2003). Hubungan struktur dan aktivitas kurkumin terkait dengan gugus-gugus fungsional senyawa tersebut, yaitu sebagai berikut:

1. Aktivitas antioksidan oleh gugus hidroksi pada inti aromatik.
2. Gugus β diketon dan ikatan rangkap berperan dalam aktivitas biologis sebagai antiinflamasi, antikanker dan antimutagenik.
3. Dua cincin aromatis baik simetris maupun tidak simetris menentukan potensi ikatan antara senyawa obat dengan reseptor (Sardjiman, 2000).

Kurkumin juga telah banyak diteliti aktivitasnya sebagai anti kanker payudara karena mampu menghambat interaksi estrogen dengan reseptornya. Dalam penelitian yang lain, dibuktikan bahwa secara *in vitro*, kurkumin pada sel kanker payudara mampu menghambat *Reactive Oxygen Species (ROS)* dan jalur *c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)* yang akan menginduksi terjadinya apoptosis sampai 70 % (Somasundaram *et al.*, 2003).

Reseptor progesteron memiliki peranan pada regulasi proses proliferasi sel kanker payudara, yang tidak kalah pentingnya dengan

reseptor estrogen. Hormon progesteron menginduksi proliferasi sel sehingga dapat memacu kanker. Efek proliferasi ini dapat dihambat dengan pengeblokan reseptor tersebut oleh senyawa yang mampu berkompetisi dengan hormon progesteron, yang dikenal sebagai *Selective Progesterone Receptor Modulators* (SPRMs) (Hoffman, 2004). Pebriana, et al. (2008) telah membuktikan secara *in silico* kurkumin dan senyawa analog kurkumin: PGV-0, PGV-1, HGV-0, dan HGV-1, hasil modifikasi dari kurkumin, memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara. Beberapa penelitian menunjukkan kurkumin disamping sebagai senyawa anti kanker juga menunjukkan aktivitas sebagai immunomodulator.

Penelitian-penelitian yang telah dilakukan tersebut bertujuan untuk mengetahui pengaruh kurkumin terhadap sistem imunitas baik menggunakan hewan coba maupun kultur sel. Hasil evaluasi pemberian *kurkumin* harian pada tikus dengan dosis 1, 20 atau 40 mg/kg, setelah 5 minggu menunjukkan dosis tertinggi kurkumin meningkatkan level IgG secara signifikan tetapi aktivitas *delayed-type hypersensitivity* dan *natural killer cell* sama dengan nilai kontrol pada semua dosis kurkumin (South, Exon, & Hendrix, 2007).

Analisa aktivitas immunomodulator kurkumin pada mencit *Balb/c* ditemukan peningkatan total WBC secara signifikan pada hari ke 12. Kurkumin juga meningkatkan sirkulasi *antibody titre* terhadap SRBC. Kurkumin meningkatkan *plaque forming cells* (PFC) pada *spleen* dan jumlah maksimum PFC teramati pada hari ke 6 setelah immunisasi dengan

SRBC. Sel *Bone marrow cellularity* dan *alpha-esterase positive* juga meningkat oleh Kurkumin. Aktivitas fagosit makrofag juga teramati meningkat (Mazumber, 2005).

Varalakshmi, et al (2008) melalui penelitian *in vivo* menyatakan bahwa kurkumin dapat memodulasi sistem imun dengan cara meningkatkan kemampuan proliferasi sel T.

2.3 Vitamin E

Vitamin E merupakan zat gizi yang memiliki sifat antioksidan sehingga dapat mencegah atau menghambat terjadinya penyakit degeneratif. Secara fisik vitamin E larut dalam lemak. Vitamin E tidak dapat disintesa oleh tubuh sehingga harus dikonsumsi dari makanan dan suplemen.

Fungsi terpenting vitamin E adalah sebagai antioksidan. Fungsi yang lain juga dapat menstimulasi respon imunologi. Kemampuan ini terlihat dalam peningkatan kekebalan tubuh. Dari beberapa penelitian mengemukakan, bahwa kejadian infeksi akan berkurang jika kadar vitamin E dalam tubuh meningkat. Selain itu vitamin E dalam tubuh dapat menghambat konversi nitrit dalam asap rokok menjadi nitrosamine dalam perut, nitrosamine dikenal sebagai promotor tumor kanker yang berbahaya.

Beberapa bagian yang penting dalam tubuh dimana vitamin E berfungsi sebagai antioksidan yaitu pada sel membran atau lebih tepatnya pada lipid sel membran, sirkulasi LDL (*Low Density Lipoprotein*), paru-paru, hepar dan jaringan adrenalin (Buckley, 2005).

Vitamin E bekerja sebagai antioksidan karena mudah teroksidasi. Dengan demikian dapat melindungi senyawa lain dari oksidasi. Karena fungsinya sebagai antioksidan maka vitamin E merupakan pertahanan utama melawan oksigen perusak, lipid peroksida, dan radikal bebas serta menghentikan reaksi berantai dan radikal bebas.

Pada sel membran, vitamin E akan mencegah oksidasi lemak khususnya *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA), serta senyawa lain seperti vitamin A. Vitamin E pada mitokondria sel akan melindungi bagian metabolik yang akan mentransformasi bahan bakar energi ke dalam ATP (Dewoto, 2007).

Dalam jaringan lemak tubuh antioksidan dari vitamin E menyerang lipid peroksida yang merupakan hasil dari reaksi antara lipid dan radikal bebas. Lipid peroksida dianggap berbahaya karena dicurigai sebagai penyebab penyakit degeneratif. Sifat antioksidan vitamin E merupakan pertahanan melawan radikal bebas. Radikal bebas adalah suatu senyawa molekul yang mempunyai elektron yang tidak utuh (tinggal sebelah) dan tidak berpasangan. Radikal bebas merupakan senyawa yang tidak stabil dan cepat bereaksi dengan senyawa lain sehingga membentuk lebih banyak radikal bebas secara berantai. Radikal bebas ini akan menyerang pertumbuhan sel, termasuk DNA (*Deoxy Nucleic Acid*), dan asam lemak tak jenuh (PUFA). Ketika radikal bebas bereaksi dengan PUFA, reaksi berantai mendorong terbentuknya radikal bebas dalam jumlah yang banyak. Radikal

bebas dapat merusak baik struktur dan fungsi sel membran nucleic acid dan elektrondense region protein.

Hal ini mengakibatkan :

1. sel mati atau merusak respon ke sel, hormone dan neurotransmitter
2. mutasi sel yang memungkinkan menjadi karsinogenik
3. enzim dan protein menjadi tidak aktif. Sehingga terjadi kerusakan pada protein dan apabila terjadi pada lensa mata dapat menimbulkan katarak.

Dengan adanya sifat antioksidan dari vitamin E, sel dan komponen tubuh yang lain akan melindungi dari serangan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai atau oksidasi merusak. Selain itu vitamin E akan mencegah kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi, mempertahankan LDL, dan unsur tubuh yang kaya lemak melawan oksidasi. Selama radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh seimbang, kondisi ini membahayakan tubuh. Sebaliknya bila radikal bebas lebih banyak maka kerusakan seperti dikemukakan di awal dapat menyebabkan berbagai penyakit (Kamiensky, 2006).

2.4 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu molekul, atom, atau beberapa atom yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif. Suatu molekul dapat bersifat stabil jika elektronnya berpasangan, tetapi jika tidak berpasangan molekul tersebut menjadi tidak stabil dan memiliki potensi untuk merusak. Jika molekul tersebut menjadi tidak stabil dan memiliki potensi untuk merusak. Jika molekul tersebut

menjadi stabil sedangkan molekul yang diambil elektronnya menjadi tidak stabil dan berubah menjadi radikal yang memicu reaksi pembentukan radikal bebas berikutnya (reaksi berantai). Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan pada sel karena dapat menimbulkan kerusakan pada protein, dan asam nukleat (kerusakan DNA, mutasi sel). Sebagai akibatnya, pertumbuhan dan perkembangan sel menjadi tidak normal, bahkan dapat menyebabkan kematian sel (Yuniastuti, 2008).

Radikal terpenting yang terdapat dalam tubuh merupakan derivat oksigen atau oksi-radikal yang sering disebut *reactive Oxygen Species* (ROS). Radikal tersebut terdapat dalam bentuk *singlet oxygen* (${}^1\text{O}^2$), radikal hidroksil (OH^\cdot), nitrogen oksida (NO^\cdot), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal peroksil (LO_2^\cdot) (Kurnani, 2001).

2.5 Hepar

Hepar merupakan kelenjar terbesar dari tubuh. Hepar terdiri atas sel-sel hepar (hepatosit) yang tersusun radial ke arah luar vena sentralis. Sel hepar berbentuk polihedral dengan inti bulat dan terletak di tengah (Dellman dan Brown, 2002). Pada tikus, hepar terletak pada bagian kanan region epigastricus, tepat dibelakang diafragma (Rogers and Dintzis, 2012). Hepar memiliki dua lobus utama, yaitu lobus kanan dan kiri. Lobus kanan dibagi menjadi segmen anterior dan posterior oleh fisura segmentalis dextra, sedangkan lobus kiri dibagi menjadi segmen medial dan lateral oleh ligament falsiformis yang terlihat dari luar (Snell, 2006). Setiap lobulus berbentuk heksagonal dengan ukuran 0,7 x 2 mm yang

terdiri atas sel-sel parenkim hepar (hepatosit), vena sentralis, sinusoid, cabang-cabang arteri hepatis, sel Kupffer, duktus empedu, buluh darah limfatik dan saraf (Dancygier, 2010).

Pada beberapa sinusoid akan ditemukan sel Kupffer, yang merupakan sel makrofag normal yang ditemukan di hepar. Permukaan hepar diliputi oleh lapisan jaringan ikat padat, dan ditutupi oleh peritoneum. Hepar tersusun dalam lobulus yang didalamnya mengalir darah melewati sel-sel hepar melalui sinusoid dari cabang vena porta hepatis ke dalam vena sentralis tiap lobulus. Setiap lobulus hepar terbangun dari berbagai komponen, yaitu sel-sel parenkim hepar (hepatosit), vena sentralis, sinusoid, cabang-cabang vena porta, cabang-cabang arteri hepatis, sel Kupffer dan kanalikuli biliaris. Sel-sel Kupffer yang berada dalam lumen sinusoid bertindak sebagai makrofag yang memiliki fungsi fagositik (Ganong, 2003).

Hepar mendapat vaskularisasi ganda, yaitu melalui vena porta dan vena hepatis. Melalui vena porta masuk darah yang berasal dari saluran pencernaan dan organ abdomen lain yaitu limpa, pankreas dan kantung empedu. Darah yang masuk mengandung berbagai nutrisi yang baru diserap dan siap untuk diproses lebih lanjut oleh hepar. Selain nutrisi, turut masuk berbagai bakteri, darah merah yang sudah tua dan toksin yang harus diolah, dihancurkan atau juga disimpan. Sebanyak 75-80 % darah pada organ hepar berasal dari vena porta sedangkan dari arteri hepatis

mengalir sekitar 20-25 % darah yang kaya oksigen (MacLachan dan Cullen, 2005).

Hepar adalah organ terbesar dan mempunyai fungsi metabolisme paling kompleks di dalam tubuh. Organ ini terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian besar obat dan toksikan. Hepatosit merupakan sel utama yang bertanggung jawab terhadap peran sentral hepar dalam metabolisme. Sel-sel ini terletak diantara sinusoid yang terisi darah dan empedu. Hepar mendapat darah dari vena porta dan arteri hepatica, kemudian disalurkan melalui vena sentralis dan vena hepatica kedalam vena cava. Hepar sering menjadi organ sasaran kerusakan karena beberapa hal. Sebagian besar toksikan memasuki tubuh melalui sistem gastrointestinal, dan setelah diserap toksikan dibawa oleh vena porta ke hepar. Hepar memiliki enzim yang mampu memetabolisme xenobiotik (terutama sitokrom P-450). Hal ini menyebabkan sebagian besar toksikan menjadi kurang toksik dan mudah larut air, sehingga lebih mudah dieksresikan. Toksikan dapat menyebabkan berbagai perubahan pada berbagai organel sel hepar, sehingga mengakibatkan perlemakan hepar, nekrosis hepar, kolestasis dan sirosis (Lu, 2005).

Fungsi detoksikasi pada substansi yang larut dalam air akan lebih mudah dieksresikan melalui ginjal. Fungsi detoksikasi sangat berhubungan erat dengan fungsi ekresi, karena hepar mempunyai kemampuan untuk mengeksresikan berbagai macam substansi sederhana, seperti logam berat yang tidak diubah lewat empedu (Kelly, 2003). Hepar adalah lokasi yang

paling penting dalam sintesis protein. Hampir semua protein serum disintesis di hepar, termasuk protein yang kritis seperti albumin dan faktor pembekuan darah (Cunningham, 2002).

Dalam kaitannya dengan suplai oksigen dan nutrisi, hepar terdiri dari tiga zona yaitu, zona pertama adalah zona yang terletak paling dekat dengan vena sentralis. Pada zona ini suplai oksigen dan nutrisi paling banyak. Zona kedua adalah midzona atau zona yang terletak di tengah lobulus yang mendapat suplai oksigen dan nutrisi sedang. Zona ketiga adalah zona yang letaknya paling jauh dari vena sentralis. Zona ketiga adalah zona yang paling sedikit mendapatkan suplai oksigen sehingga pada zona ini mudah mengalami hipoksia. Pada zona pertama terjadi sintesis glukosa dan glikogenolisis. Zona ini merupakan daerah yang penting tempat terjadinya metabolisme konjugasi obat-obatan. Zona kedua merupakan tempat penyimpanan glikogen, lemak, formasi pigmen dan tempat metabolisme obat-obatan serta racun. Zona ketiga menunjang fungsi lainnya (MacFarlane et al, 2000).

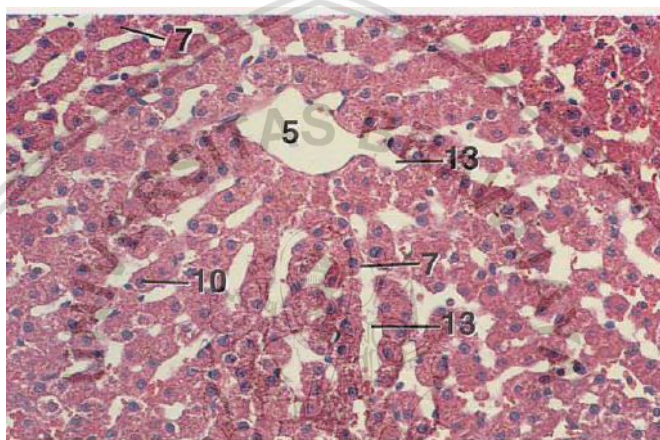
Hepar sering menjadi organ sasaran kerusakan karena beberapa hal. Sebagian besar bahan toksik masuk ke tubuh melalui sistem gastrointestinal dan setelah diserap, toksin akan dibawa oleh vena porta ke hepar. Toksik dapat menyebabkan berbagai perubahan pada berbagai organel sel hepar, sehingga mengakibatkan perlemakan hepar, nekrosis, kolestasis, dan sirosis (Lu 2005).

Hepar adalah organ yang paling umum mengalami kerusakan karena racun. Hal ini disebabkan hepar menerima suplai darah dari vena porta sekitar 80%, yang mengalir dari saluran pencernaan. Bahan-bahan toksik dari saluran cerna seperti yang berasal dari tumbuhan, fungi dan produk bakteri akan diabsorpsi ke dalam pembuluh darah portal dan ditransfer ke hepar, karena hepar merupakan organ detoksikasi (MacLachlan dan Cullen 2005).

Hepar dapat mengalami beberapa perubahan, kerusakan pada hepar dapat bersifat *irreversible* (tetap) dan *reversible* (sementara). Degenerasi merupakan kerusakan yang *reversible*, dimana sel mengalami perubahan struktur normal. Penyebab degenerasi sel bermacam-macam antara lain gangguan metabolisme, toksik dan trauma. Apabila degenerasi sel berlangsung terus-menerus, maka dapat menyebabkan kematian sel (nekrosa).

Degenerasi sel dapat berupa degenerasi berbutir, degenerasi hidropis dan degenerasi lemak. Degenerasi terjadi karena adanya gangguan biokimiawi yang disebabkan oleh iskemia, anemia, metabolisme abnormal dan zat kimia yang bersifat toksik. Degenerasi yang berlangsung terus-menerus akan menyebabkan kematian sel yang bersifat menetap (*irreversible*). Kematian sel dapat terjadi melalui proses apoptosis dan nekrosa sel. Apoptosis merupakan mekanisme biologi yang merupakan salah satu jenis kematian sel terencana. Apoptosis digunakan oleh organisme multisel untuk membuang sel yang sudah tidak diperlukan oleh

tubuh. Apoptosis berbeda dengan nekrosis. Apoptosis pada umumnya berlangsung seumur hidup dan bersifat menguntungkan bagi tubuh, sedangkan nekrosis adalah kematian sel yang disebabkan oleh kerusakan sel secara akut. Keputusan untuk melakukan apoptosis berasal dari sel itu sendiri, dari jaringan yang mengelilinginya, atau dari sel yang berasal dari sistem imun (Hodgson and Levi. 2000).



Gambar 2.3 Gambaran Histopatologi Normal organ Hepar Tikus, Pewarnaan Hematoksilin Eosin, Perbesaran 400x

Keterangan: 5: Vena sentralis; 7: Hepatosit; 10: Nucleus hepatosit; 13: Sinusoid

2.6 Malondialdehidaa (MDA)

Proses patofisiologi yang melibatkan pembentukan radikal bebas menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan, hal ini banyak dipelajari terutama pada penyakit degeneratif dan terjadinya proses inflamasi. Di dalam tubuh, radikal bebas dapat menyebabkan proses peroksidasi lipid. Malondialdehidaa merupakan produk peroksidasi asam lemak rantai panjang yang meningkat ketika terjadi proses peroksidasi lipid. Sehingga MDA yang merupakan produk akhir proses peroksidasi lipid dan yang

paling sering digunakan untuk mengukur proses peroksidasi lipid (Suwandi, 2012). Peroksidasi lipid adalah kerusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang menghasilkan senyawa malondialdehida (MDA). Dengan demikian MDA dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas dalam tubuh. Tingginya kadar MDA di dalam tubuh dapat disebabkan oleh meningkatnya aktivitas radikal bebas (Halliwell, 2007).

Peroksidasi lipid adalah mekanisme dari trauma sel, baik pada tumbuhan ataupun hewan, dengan demikian peroksidasi lipid digunakan sebagai indikator dari stres oksidatif pada sel dan jaringan. Endoperoksida lipid yang berasal dari asam lemak tak jenuh ganda, bersifat tak stabil dan terurai membentuk beberapa senyawa kompleks, termasuk senyawa karbonil reaktif, terutama malondialdehida (MDA) sehingga pengukuran MDA sering digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid jaringan (Mc Kee, 2003).

Kadar MDA di dalam tubuh dapat meningkat melalui beberapa proses seperti aktivitas fisik yang meningkat sehingga metabolisme juga meningkat. Kehidupan dengan aktivitas fisik berat dan pengaruh lingkungan yang menyebabkan terbentuknya radikal bebas sulit dihindari. Antioksidan diketahui dapat mencegah terbentuknya radikal bebas. (Droge, 2002).

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan dasar reaksi MDA dengan asam tiobarbiturat (TBA) yang membentuk senyawa berwarna

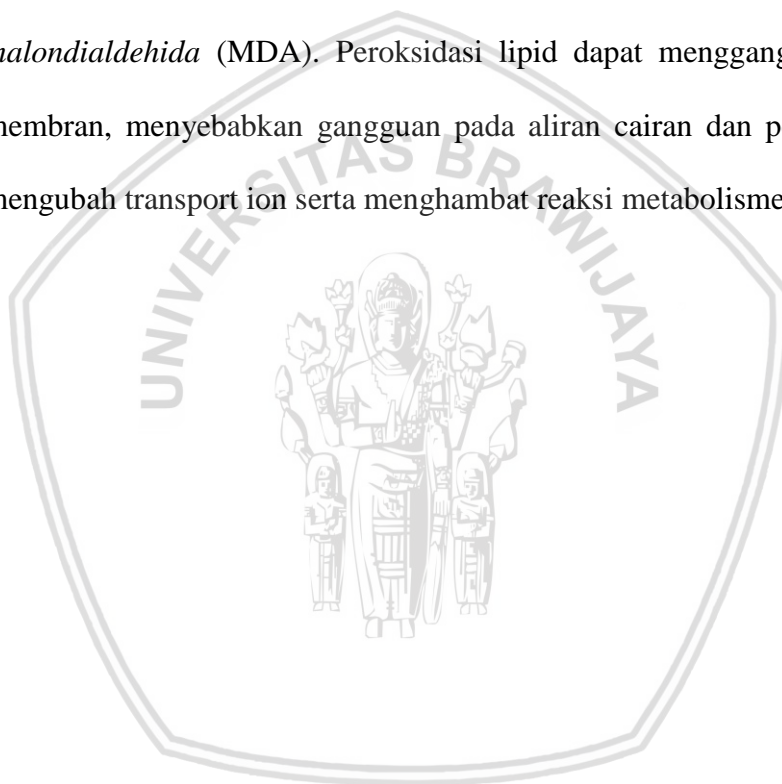
MDA-TBA₂ dan mengabsorpsi sinar dengan panjang gelombang 532-534 nm. Senyawa berwarna tersebut dapat diukur konsentrasinya berdasarkan absorbansi warna larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya menggunakan spektrofotometer (NCLSSTM *Malondialdehyde Assay*) (Mardiany, 2008).

2.6.1 Mekanisme Pembentukan MDA

Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluar sehingga bersifat tidak stabil. Radikal bebas berusaha menstabilkan diri dengan mengambil elektron dari molekul lain. Pada keadaan normal terjadi keseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas antioksidan di dalam sel (Bag, 2008). Jika keseimbangan tersebut terganggu akan menimbulkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan komponen sel. Salah satu kerusakan yang diakibatkan oleh kondisi stres oksidatif adalah peroksidasi lipid (Halliwell, 2007).

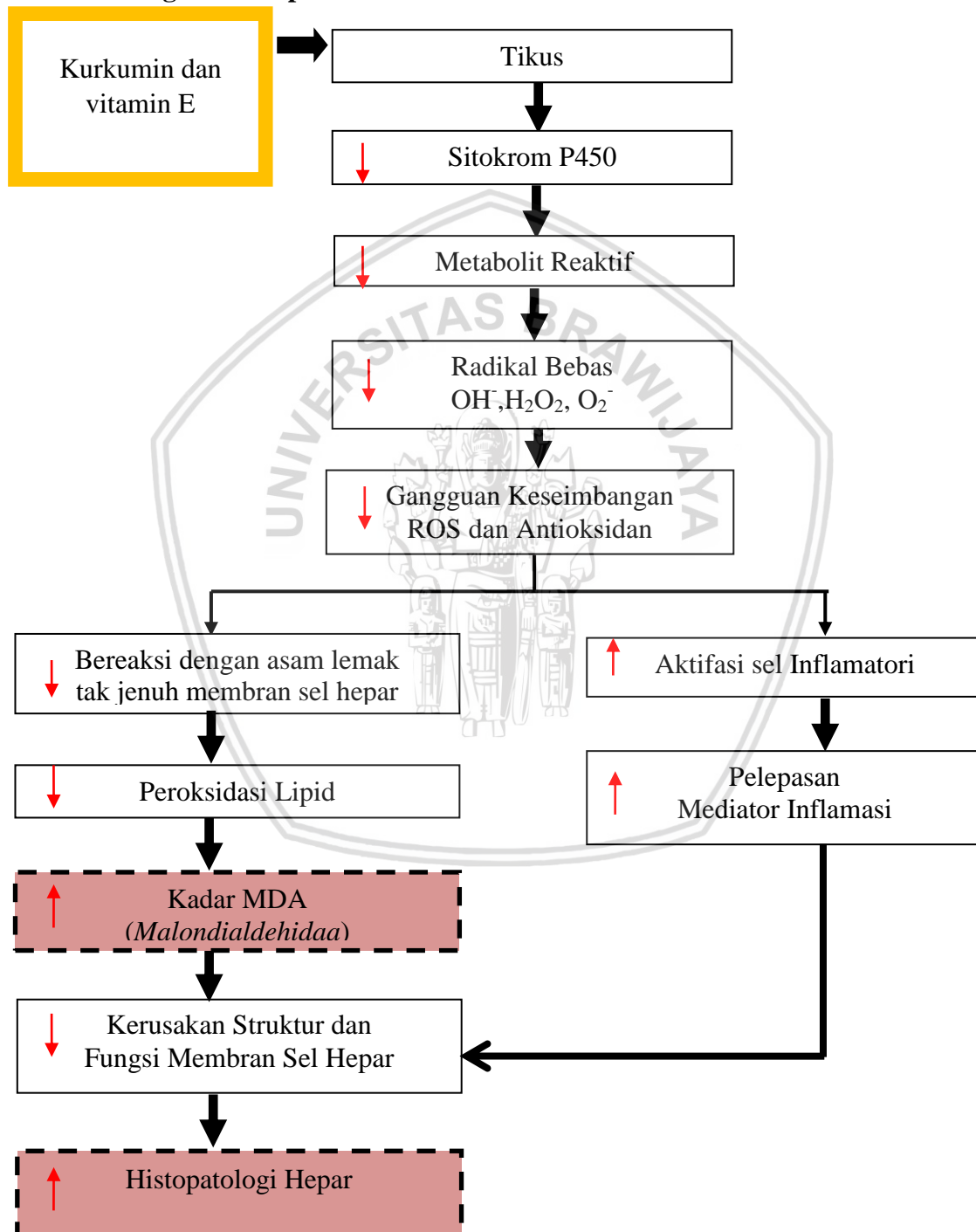
Stres oksidatif dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid pada jaringan yang dapat merusak sel dan fungsi membran sel. Terjadinya peroksidasi lipid akan meningkatkan produksi *malondialdehida* (MDA). Menurut Grotto et al., (2009), peroksidasi lipid terjadi ketika *Polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yaitu komponen penyusun membran sel diserang oleh radikal bebas. PUFA memiliki ikatan ganda karbon-karbon yang menjadi target utama dari radikal bebas. Radikal bebas akan melemahkan ikatan karbon hidrogen, sehingga pemindahan hidrogen dapat

terjadi dengan mudah. Atom hidrogen yang terlepas akan membentuk radikal lipid dan menghasilkan suatu radikal lipid peroksil ketika mengalami oksidasi. Radikal peroksil selanjutnya mengalami reaksi dengan PUFA lain, pemindahan elektron, hingga dihasilkan lipid hidroperoksida dan radikal lipid lain. Salah satu produk akhir dan biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif adalah *malondialdehida* (MDA). Peroksidasi lipid dapat mengganggu fisiologi membran, menyebabkan gangguan pada aliran cairan dan permeabilitas, mengubah transport ion serta menghambat reaksi metabolisme.



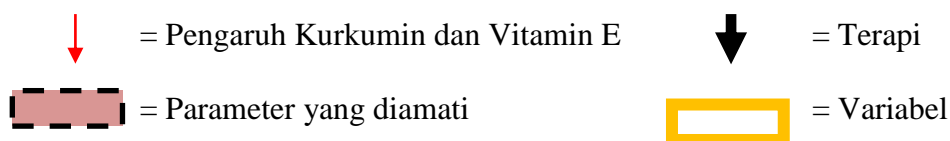
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konsep Penelitian

Keterangan :



Dalam hepar kurkumin akan menekan kerja sitokrom P-450, dimana kerja sitokrom P-450 ini adalah mengoksidasi metabolit-metabolit yang masuk ke dalam hepar agar dapat diekskresi oleh ginjal. Penekanan kerja dari kompleks enzim P450 ini akan membuat banyak metabolit reaktif tertimbun dan mengumpul di dalam hepar.

Pemberian kurkumin dan vitamin E secara berlebihan dapat menyebabkan kerusakan pada sel hepar yang disebabkan oleh stres oksidatif akibat peningkatan jumlah radikal bebas di dalam tubuh. Stres oksidatif merupakan keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan antioksidan yang ada dalam tubuh. Ada dua faktor penyebab terjadinya stres oksidatif, yang pertama karena berkurangnya atau tidak adanya antioksidan, baik enzimatis maupun non enzimatis dan yang kedua adalah adanya peningkatan radikal bebas baik endogen maupun eksogen (Hudgson, 2004).

Di dalam tubuh radikal bebas dapat menyebabkan proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid adalah perusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acid*), seperti asam linoleat, asam linolenat dan asam arakhidonat yang menghasilkan senyawa malondialdehid (MDA) yang menandakan adanya kerusakan sel hepar.

Dalam tubuh tikus terbentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terdiri atas radikal superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^\cdot), radikal peroksil (ROO^\cdot) dan dapat meningkat apabila jumlah antioksidan endogen tidak mencukupi untuk menstabilkan radikal bebas. Kondisi ketidakseimbangan radikal bebas dan antioksidan ini mengakibatkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan gangguan pada proses oksidasi fosforilasi sehingga terjadi peningkatan produksi ROS. Peningkatan produksi ROS menyebabkan sel-sel jaringan nekrosis sehingga meningkatkan fagositosis dari makrofag. Adanya fagositosis makrofag merangsang keluarnya sitokin proinflamatori berupa IL- 1β , IL-6 dan TNF- α . Sitokin proinflamatori memicu aktivasi dan migrasi neutrofil ke jaringan serta pelepasan protease yang menyebabkan kerusakan jaringan (Kumar, *et al.*, 2007). Proses inflamasi yang terjadi memicu keluarnya radikal bebas seperti ROS dalam jumlah banyak. Radikal bebas tersebut menyebabkan stres oksidatif yang memicu peningkatan peroksidasi lipid dan meningkatkan kadar Malondialdehidaa (MDA) (Mudassir, *dkk.*, 2012). Kerusakan sel hepar akan berpengaruh terhadap gambaran histopatologi hepar pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*).

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian Kurkumin dan Vitamin E dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan meningkatnya aktivitas senyawa maalondialdehida (MDA) dan kerusakan pada sel hepar yang menyebabkan perubahan histopatologi hepar pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*).

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2016 – Oktober 2016 di Laboratorium Biosains sebagai tempat pemeliharaan hewan coba , sedangkan pengujian kadar MDA dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan pengamatan Histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan alat-alat meliputi kandang tikus, timbangan untuk menimbang berat badan tikus, sonde, gunting bedah, pinset, jarum pentul, kertas label, *microtube*, *micropipete*, tabung reaksi, labu ukur (10 ml, 50 ml, 100 ml), alat sentrifugasi, labu erlenmeyer, *spectrophotometer*, *sput*, *scalpel*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan dan betina dengan berat badan awal 140-150 gram, alkohol 70%, *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7, NaCl fisiologis, akuades, kurkumin, dan vitamin E.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol 1, kelompok kontrol 2, kelompok perlakuan 3, perlakuan 4. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus sebagai ulangan.

4.4 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria inklusi hewan model adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, jenis kelamin jantan dan betina, umur 9-10 minggu, berat badan antara 140-150 gram, kondisi sehat (aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi layak etik penelitian oleh KEP UB, dan belum pernah digunakan penelitian.

4.5 Pembagian Kelompok Penelitian

Pembagian kelompok perlakuan pada penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus jantan 5 ekor tikus betina. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol 14 hari. Kelompok kedua adalah kelompok kontrol 28 hari. Kelompok ketiga adalah kelompok yang diterapi menggunakan kombinasi kurkumin dengan dosis sebanyak 72 mg/kg BB dan vitamin E sebanyak 200IU satu kali sehari selama 14 hari. Kelompok ke empat adalah kelompok yang diterapi

menggunakan kombinasi kurkumin dengan dosis sebanyak 72 mg/kg BB dan vitamin E sebanyak 200IU satu kali sehari selama 28 hari.

Tabel 4.1. Rancangan kelompok penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
Aktivitas kurkumin dan kadar MDA	1	2	3	4
Kontrol negatif 14 hari jantan dan betina				
Kontrol negatif 28 hari jantan dan betina				
Kelompok 1 (terapi 72 mg/kg BB 14 hari jantan)				
Kelompok 2 (terapi 72 mg/kg BB 14 hari betina)				
Kelompok 3 (terapi 72 mg/kg BB 28 hari jantan)				
Kelompok 4 (terapi 72 mg/kg BB 28 hari betina)				

yaknya hewan model yang diperlukan dalam penelitian dapat dihitung dengan menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$ (Kusriningrum, 2008).

$$\text{Sehingga : } p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah minimal ulangan yang diperlukan

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, untuk lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal empat kali ulangan dalam setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan empat kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga jumlah seluruh tikus yang diperlukan sebanyak 20 ekor.

4.6 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- Variabel Bebas : Terapi kombinasi kurkumin (*Curcuma longa*) dan vitamin E
- Variabel tergantung : Gambaran histopatologi Hepar dan kadar *Malondialdehida* (MDA) Hepar
- Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina Strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram.

4.7 Tahapan Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba (*Rattus norvegicus*)

Tikus yang digunakan untuk penelitian di aklimatisasi selama tujuh hari, sehingga dapat beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Tikus di beri pakan ransum basal yang disusun berdasarkan AOAC (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin dan air. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dan setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus.

Kandang tikus berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm, dengan jumlah tikus sesuai dengan kebutuhan. Kandang terbuat dari bahan *stainless steel*. Suhu optimum untuk kandang tikus adalah 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup. Kandang tikus harus berlokasi di tempat yang tenang, sehingga tikus tidak stres.

4.7.2 Pemberian Terapi Kurkumin dan Vitamin E

Pemberian terapi kurkumin dan vitamin E dilakukan dengan cara per oral menggunakan sonde lambung terdiri dari 4 ekor tikus jantan dan 4 ekor tikus betina yang diterapi dengan menggunakan kombinasi kurkumin dengan dosis sebanyak 72 mg/kg BB dan vitamin E sebanyak 200IU satu kali sehari selama diberikan selama 14 hari untuk kelompok positif pertama dan diberikan selama 28 hari untuk kelompok positif kedua. Sonde lambung yang digunakan adalah spuit sonde ukuran 5 ml. Kurkumin dan vitamin E yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam spuit sonde ukuran 5 ml. Kemudian diberikan pada hewan coba yang sebelumnya diencerkan menggunakan NaCl.

4.7.3 Pembuatan Preparat Histopatologi

-Pengambilan Sampel Organ Hepar

Pengambilan sampel organ hepar dilakukan setelah tikus diberi perlakuan selama 3 minggu. Tikus dibunuh dengan cara *cervicalis dislocation*, lalu abdomen tikus dibedah dan organ hepar diambil dengan sangat hepar-hepar untuk menghindari kerusakan jaringan. Sampel organ dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.9% untuk menghilangkan darah. Proses pembuatan preparat histopatologi terdiri dari fiksasi,

dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan digelas objek serta pewarnaan.

Proses fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan jaringan. Tahapan fiksasi dilakukan dengan memasukkan jaringan hepar kedalam larutan PFA 10%, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi. Proses menghilangkan PFA dilakukan dengan merendam jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat mulai dari 70% selama 24 jam, kemudian didalam etanol 80% selama 2 jam, dilanjutkan etanol 90%, sampai absolut (100%) masing-masing membutuhkan waktu 20 menit. Tahapan selanjutnya yaitu penghilangan etanol, dengan cara jaringan hepar dipindahkan dari alkohol absolut kedalam larutan penjernihan yaitu xylol I (20 menit), xylol II (30 menit). Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dilakukan dalam paraffin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C.

Proses *embedding* dilakukan dengan memasukkan jaringan kedalam paraffin cair. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil hasil *embedding* pada penjepit (*block holder*). *Sectioning* diawali dengan mengatur ketebalan irisan dengan ukuran $\pm 4-5 \mu\text{m}$ dengan menggunakan mikrotom. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40°C untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* 38-40°C

sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40°C lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Ahmada, 2014).

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hemaktosilin eosin. Proses pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan memasukkan preparat kedalam alkohol bertingkat konsentrasi alkohol yang digunakan 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama tiga menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dilanjutkan dengan merendam kedalam air akuades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna hemaktosilin selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan kemudian dicuci dengan akuades selama 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan menggunakan eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan akuades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70 %, 80%, 90%, dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II, dan III masing-masing 2 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan xylol I, II, dan III selama 3 menit. Terakhir, dilakukan *mounting* (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *coverglass* yang selanjutnya diamati menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 400x dan 1000x (Talley et al., 2011).

4.7.4 Pemeriksaan Malondialdehida (MDA)

- Pengukuran kurva standar MDA

Larutan stok kit MDA konsentrasi 0, 1, 2,3, 4, 5, 6. 7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$ diambil 100 μL , dimasukan dalam ependrof yang berbeda, ditambahkan aquades 550 μL , 100 μL TCA 10%, 250 μL HCl 1 N, 100 μL Na-Thio 1 % dan dihomogenkan. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil, dipanaskan dalam waterbath suhu 100°C selama 30 menit, dibiarkan dalam suhu ruangan, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ maks (532 nm). Hasil absorbansi kemudian dibuat kurva standar MDA dan dihasilkan persamaan linear (Amin, 2009).

- Pengukuran kadar MDA hepar dengan Uji TBA

Organ hepar dengan berat 1 gram dimasukkan ke dalam mortar dingin dan digerus hingga halus. Kemudian 500 μL NaCl 0,9% ditambahkan dan dilakukan homogenasi. Homogenat diambil dan dipindahkan ke tabung ependorf. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Supernatan sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 550 μL , 100 μL TCA, 100 μL HCL 1 N ,100 μL Na-Thio 1 % dan dihomogenkan kembali. Setelah itu disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit, dipanaskan dalam water bath

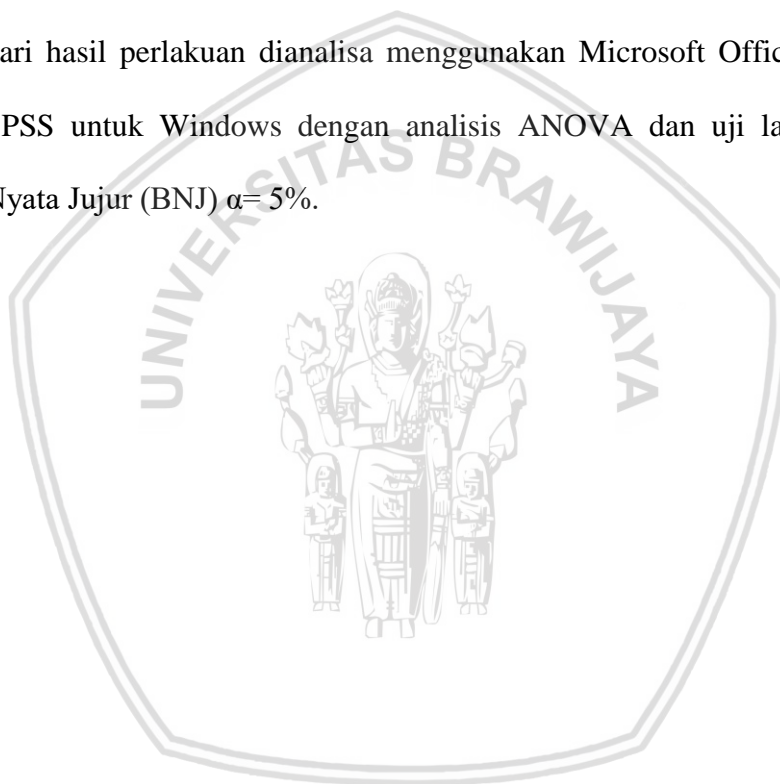
100°C selama 30 menit. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum ($\lambda_{\text{maks}} = 532 \text{ nm}$) (Amin, 2009).

4.7.5 Isolasi Protein dan Pengukuran Kadar Malondialdehidaa

Isolasi protein dilakukan dengan penggerusan organ hepar sebanyak 0,225 g pada mortar dingin, kemudian ditambahkan 500 μl NaCl fisiologis 0,9%, selanjutnya homogenat dipindah kedalam ependorf. Selanjutnya ependorf disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 500 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil 100 μl dimasukkan kedalam ependorf, ditambah 550 μl akuades, 100 μl TCA kemudian dihomogenkan dengan vortex, ditambahkan 250 μl HCL 1N lalu dihomogenkan dengan vortex. Kemudian ditambahkan dengan 100 μl Na-Thio 1% dan dihomogenkan kembali dengan vortex. Setelah itu, mulut tabung ditutup menggunakan plastix wrap dan dipanaskan dalam *water bath* 100°C selama 30 menit. Setelah dipanaskan, dilakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 500 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindah kedalam tabung reaksi baru. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (533 nm) (Amin, 2009).

4.8 Analisis Data

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi hepar dan kadar malondialdehidaa. Gambaran histopatologi hepar diamati secara deskriptif sedangkan kadar *malondialdehida* (MDA) diamati secara kuantitatif menggunakan Uji TBA. Data yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisa menggunakan Microsoft Office Excel dan SPSS untuk Windows dengan analisis ANOVA dan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha=5\%$.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Kombinasi Kurkumin dan Vitamin E terhadap Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Jaringan pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) jaringan hepar tikus dilakukan untuk mengetahui pengaruh terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E pada tikus (*rattus norvegicus*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E yang digunakan sebagai terapi pada tikus mampu menurunkan kadar MDA. Penurunan kadar MDA sangat erat hubungannya dengan kadar ROS (Reactive Oxygen Species) dalam tubuh. Semakin tinggi kadar MDA maka mengindikasikan semakin tinggi pula kadar ROS dalam tubuh, sebaliknya semakin rendah kadar MDA semakin rendah pula kadar ROS dalam tubuh. Penurunan kadar MDA dapat digunakan sebagai salah satu tanda adanya perbaikan kerusakan organ (Wulandari, 2012). Penetapan kadar *malondialdehyde* (MDA) dengan metode uji asam tiobarbiturat (TBA) dapat diukur secara spektrofotometrik berdasarkan prinsip bahwa asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA/ *poly-unsaturated fatty acid*) dapat mengalami proses peroksidasi menjadi peroksida lipid yang kemudian mengalami dekomposisi menjadi *malondialdehyde* (MDA). MDA bila direaksikan dengan asam tiobarbiturat, akan membentuk senyawa merah muda yang menyerap cahaya panjang gelombang maksimal. Jumlah *malondialdehyde* (MDA) yang terbentuk dapat menggambarkan proses peroksidasi lipid (Amirkhizi, *et al.*, 2007).

Tabel 5.1 Kadar *malondialdehyde* (MDA) jaringan hepar tikus

Perlakuan	Rata-rata kadar MDA ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan dari kontrol negatif	Penurunan dari kontrol positif
Kontrol negatif 14 hari jantan	1237,25 \pm 0,81 ^c	-	-
Kontrol negatif 14 hari betina	1062,25 \pm 0,81 ^c	-	-
Kontrol negatif 28 hari jantan	1573 \pm 0,09 ^d	27,1	-
Kontrol negatif 28 hari betina	1166,25 \pm 0,09 ^d	9,79	-
Pemberian terapi 14 hari jantan (K1)	1044 \pm 0,56 ^a	-	15,61
Pemberian terapi 14 hari betina (K2)	99,75 \pm 0,56 ^a	-	90,6
Pemberian terapi 28 hari jantan (K3)	1058,5 \pm 0,48 ^b	-	14,46
Pemberian terapi 28 hari betina (K4)	1012,25 \pm 0,48 ^b	-	4,70

Keterangan : Notasi a,b,c,d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($P < 0,05$).

Hasil analisa secara statistika menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa pemberian kombinasi kurkumin dan vit e secara signifikan ($p < 0,05$) mampu menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) sebagaimana ditunjukkan pada tabel 5.1. Hasil lanjutan menggunakan *Tukey/Beda Nyata Jujur* (BNJ) menunjukkan bahwa rata-rata kadar MDA jaringan hepar kelompok kontrol negatif dan kelompok terapi menggunakan kombinasi kurkumin dan vitamin E 14 hari tidak berbeda signifikan ($p < 0,05$), tetapi terjadi penurunan pada kelompok terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari, sehingga terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari merupakan durasi optimal dalam menurunkan kadar MDA tikus (*Rattus norvegicus*).

Kadar MDA kelompok kontrol negatif merupakan standar yang dipergunakan untuk mengetahui adanya penurunan atau peningkatan kadar MDA yang terjadi pada kelompok kontrol positif, kelompok Pemberian terapi 14 hari jantan (K1), kelompok Pemberian terapi 14 hari betina (K2), kelompok Pemberian terapi 28 hari jantan (K3), dan kelompok Pemberian terapi 28 hari betina (K4). Kadar *malondialdehyde* (MDA) merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid, yang biasanya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid dan menggambarkan derajat stres oksidatif (Sutari, dkk., 2013). Secara normal, radikal bebas diproduksi oleh tubuh dalam jumlah kecil sebagai akibat dari berbagai proses metabolisme dalam tubuh. Radikal bebas diproduksi oleh beberapa komponen penyusun sel, seperti mitokondria, membran plasma, lisosom, retikulum endoplasma dan nukleus. Radikal bebas yang diproduksi merupakan

hasil samping dari proses oksidasi atau metabolisme sel yang berlangsung selama respirasi sel dan pencernaan (Pham-Huy *et al.*, 2008). Sehingga rata-rata kadar MDA kelompok kontrol negatif termasuk dalam normal karena tikus pada kelompok kontrol negatif tidak mendapatkan perlakuan apapun dan rata-rata kadar MDA yang terbentuk merupakan hasil dari proses metabolisme dalam tubuh.

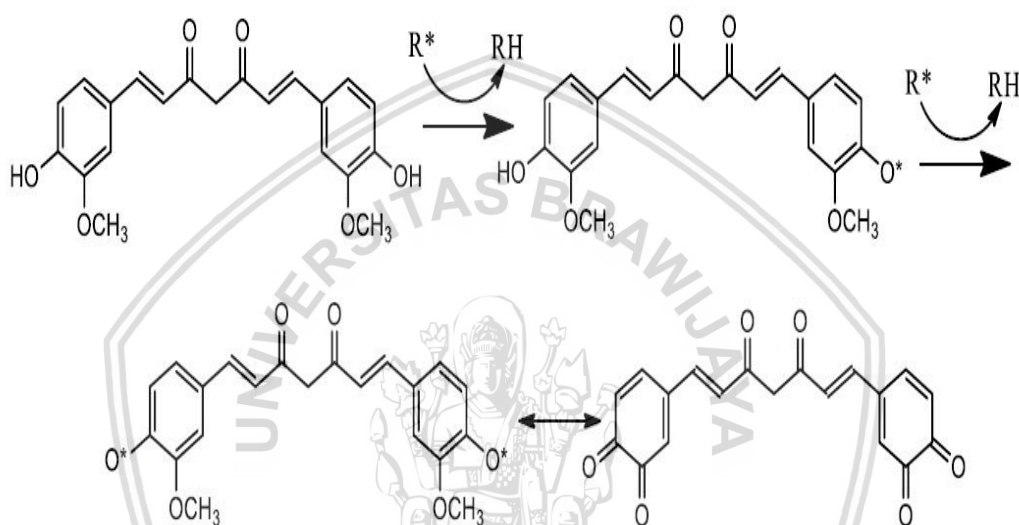
Rata-rata kadar *malondialdehyde* (MDA) pada kelompok tikus jantan kontrol positif 14 hari (K1) sebesar $1044 \pm 0,56^a$ $\mu\text{g/mL}$ atau terjadi penurunan rata-rata kadar MDA dengan presentase sebesar 15% dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif jantan 14 hari sebesar $1237,25 \pm 0,81^c$ $\mu\text{g/mL}$. Rata-rata kadar MDA pada kelompok tikus betina kontrol positif 14 hari (K2) sebesar $99,75 \pm 0,56^a$ $\mu\text{g/mL}$ atau terjadi penurunan rata-rata kadar MDA dengan presentase sebesar 90,6% dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif betina 14 hari sebesar $1062,25 \pm 0,81$ $\mu\text{g/mL}$. Rata-rata kadar MDA pada kelompok tikus jantan K3 positif 28 hari sebesar $1058,5 \pm 0,48^b$ $\mu\text{g/mL}$ atau terjadi penurunan rata-rata kadar MDA dengan presentase sebesar 14,46% dibandingkan dengan kelompok tikus jantan kontrol negatif 28 hari yang memiliki kadar MDA sebesar $1573 \pm 0,09^d$ $\mu\text{g/mL}$. Rata-rata kadar MDA pada kelompok tikus betina K4 kontrol positif 28 hari sebesar $1012,25 \pm 0,48^b$ $\mu\text{g/mL}$ atau terjadi penurunan rata-rata kadar MDA dengan presentase sebesar 4,7% dibandingkan dengan kelompok tikus jantan kontrol negatif 28 hari yang memiliki kadar MDA sebesar $1166,25 \pm 0,09^d$ $\mu\text{g/mL}$.

Penurunan rata-rata kadar *malondialdehyde* (MDA) yang signifikan dapat diamati pada kelompok tikus jantan dan betina terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari (K1 $1044 \pm 0,56^a$ $\mu\text{g/mL}$ dan K2 $99,75 \pm 0,56^a$ $\mu\text{g/mL}$) optimal dalam menurunkan kadar MDA jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*). Hal ini ditunjukkan dengan kadar MDA kelompok K1 dan K2 yang berbeda

signifikan ($p < 0,05$) dengan presentase K1 sebesar 15% dan K2 sebesar 90% dibandingkan dengan kelompok tikus jantan dan betina kontrol negatif 14 hari. Penurunan rata-rata kadar *malondialdehyde* (MDA) jaringan hepar kelompok terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E 14 hari (K1 dan K2) merupakan durasi optimal dalam menurunkan kadar MDA jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*). Hal ini ditunjukkan dengan kadar MDA jaringan hepar kelompok K1 dan K2 yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif.

Penurunan rata-rata kadar MDA pada kelompok tikus jantan terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 28 hari (K3) $1058,5 \pm 0,48^b$ $\mu\text{g/mL}$ atau terjadi penurunan rata-rata kadar MDA dengan presentase sebesar 14,46% dibandingkan dengan kelompok tikus jantan kontrol negatif 28 hari yang memiliki kadar MDA sebesar $1573 \pm 0,09^d$ $\mu\text{g/mL}$. Jika dibandingkan dengan kelompok tikus jantan K1 yang memiliki penurunan kadar MDA sebesar 15% maka tidak terjadi perbedaan yang signifikan. Menurut Kram (2010), hal ini dapat disebabkan karena tikus jantan memiliki hormon yang stabil. Pada kelompok tikus betina terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 28 hari (K4) $1012,25 \pm 0,48^b$ $\mu\text{g/mL}$ atau terjadi penurunan rata-rata kadar MDA dengan presentase sebesar 4,70% dibandingkan dengan kelompok tikus betina kontrol negatif 28 hari yang memiliki kadar MDA sebesar $1166,25 \pm 0,09^d$ $\mu\text{g/mL}$. Jika dibandingkan dengan kelompok tikus betina K2 yang memiliki penurunan kadar MDA sebesar 90% maka terdapat perbedaan presentase yang cukup jauh. Menurut Krinke (2008), Hal ini dapat disebabkan oleh faktor hormon tikus betina yang tidak stabil jika

dibandingkan dengan tikus jantan yang memiliki hormon yang lebih stabil. Tikus betina memiliki banyak hormon yang dapat melawan maupun menghambat penyerapan bahan kimia dalam tubuh.



Gambar 5.1. Reaksi Penghambatan Radikal Bebas Oleh Kurkumin

Pemberian terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E dapat menurunkan kadar MDA yaitu dengan cara kurkumin akan mendonasikan sebuah atom hydrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) fenolik saat bereaksi dengan radikal bebas (R^*). Reaksi ini akan menghasilkan suatu radikal fenoksil kurkumin atau kurkuminoid (KO^*/FO^*) yang kurang reaktif karena (KO^*/FO^*) dapat mengalami perubahan struktur resonansi dengan mendistribusikan electron yang tidak berpasangan dalam struktur ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin aromatiknya. (KO^*/FO^*) akan bereaksi lebih lanjut membentuk senyawa yang tidak reaktif, yang kemungkinan melalui reaksi terminasi radikal-radikal. Melalui

reaksi tersebut, kurkumin dapat menghambat peroksidasi lipid yang diinisiasi oleh radikal bebas.

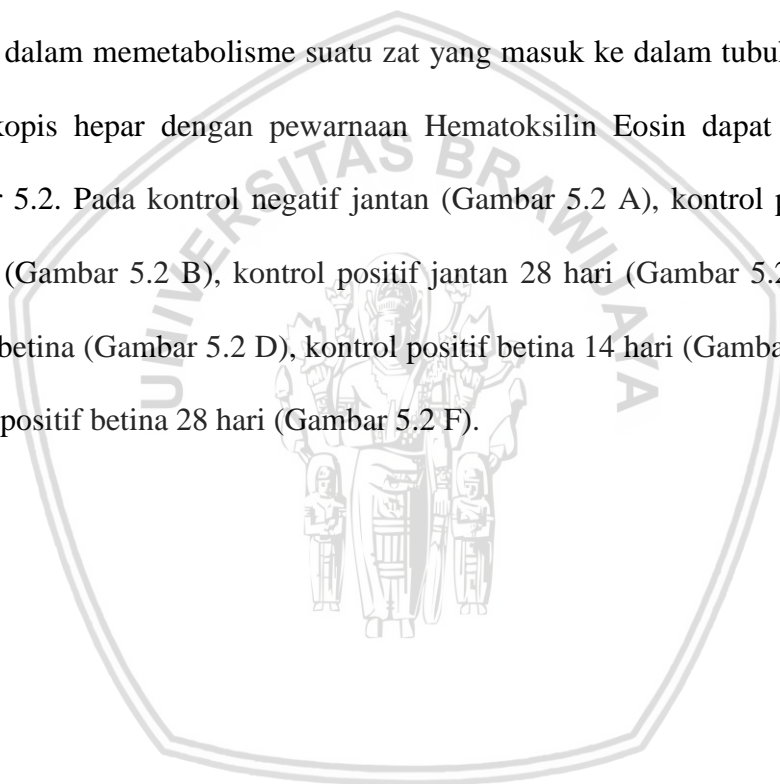
Terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari merupakan durasi yang optimal dalam menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) karena mampu menurunkan kadar MDA secara signifikan ($p < 0,05$) sebesar 90,6% dari kelompok kontrol positif. Hal ini dikarenakan kurkumin memicu secara signifikan pengeluaran radikal bebas (Harahap, 2008). Jumlah radikal bebas yang berkurang tidak akan menimbulkan stres oksidatif dan menimbulkan kerusakan komponen-komponen sel atau jaringan sehingga tidak menyebabkan peroksidasi lipid. Sehingga produk akhir peroksidasi lipid yang terbentuk, yaitu MDA berkurang.

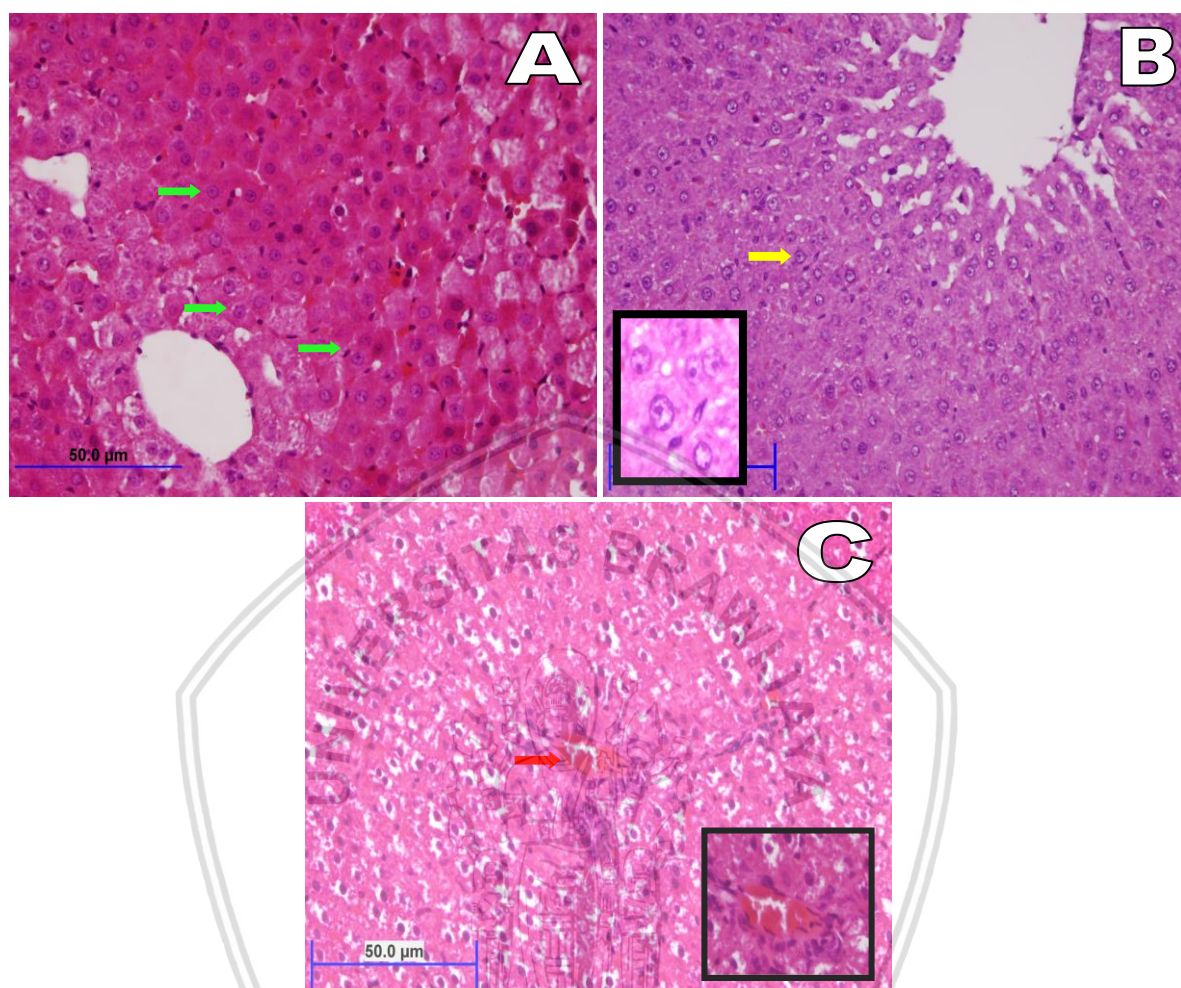
5.2 Gambaran Histopatologi Organ Hepar Tikus Setelah Diterapi dengan Kombinasi Kurkumin dan Vitamin E

Parameter keberhasilan suatu terapi, salah satunya dilihat melalui histopatologinya. Secara histologi hepar memiliki parenkim yang tampak seperti spons dengan sel-sel yang disusun didalam lempengan-lempengan yang di dalamnya terdapat sistem pembuluh kapiler yang disebut sinusoid. Parenkim tersusun di dalam lobuli-lobuli, dan ditengah-tengah lobuli terdapat 1 vena sentralis sebagai cabang-cabang dari vena hepatika (Junqueira and Carneiro, 2003). Hepar rentan terhadap gangguan metabolik, toksik, mikroba, dan obat-obatan yang dapat merusak fungsi hepar. Kloramfenikol merupakan obat yang memiliki efek samping terhadap hepar (Burt *et al*, 2007). Meskipun setelah

cedera sel-sel hepar dapat pulih kembali dalam waktu beberapa minggu melalui proses regenerasi, untuk lebih mempercepat proses perbaikan hepar diperlukan obat alami atau herbal lainnya (Kumar, 2007).

Pengamatan histopatologi hepar dengan pewarnaan HE dilakukan pada semua bagian hepar. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop Olympus BX51 perbesaran 400X. Penelitian ini dilakukan karena hepar memiliki peran penting dalam memetabolisme suatu zat yang masuk ke dalam tubuh. Gambaran mikroskopis hepar dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin dapat dilihat pada Gambar 5.2. Pada kontrol negatif jantan (Gambar 5.2 A), kontrol positif jantan 14 hari (Gambar 5.2 B), kontrol positif jantan 28 hari (Gambar 5.2 C), kontrol negatif betina (Gambar 5.2 D), kontrol positif betina 14 hari (Gambar 5.2 E), dan kontrol positif betina 28 hari (Gambar 5.2 F).

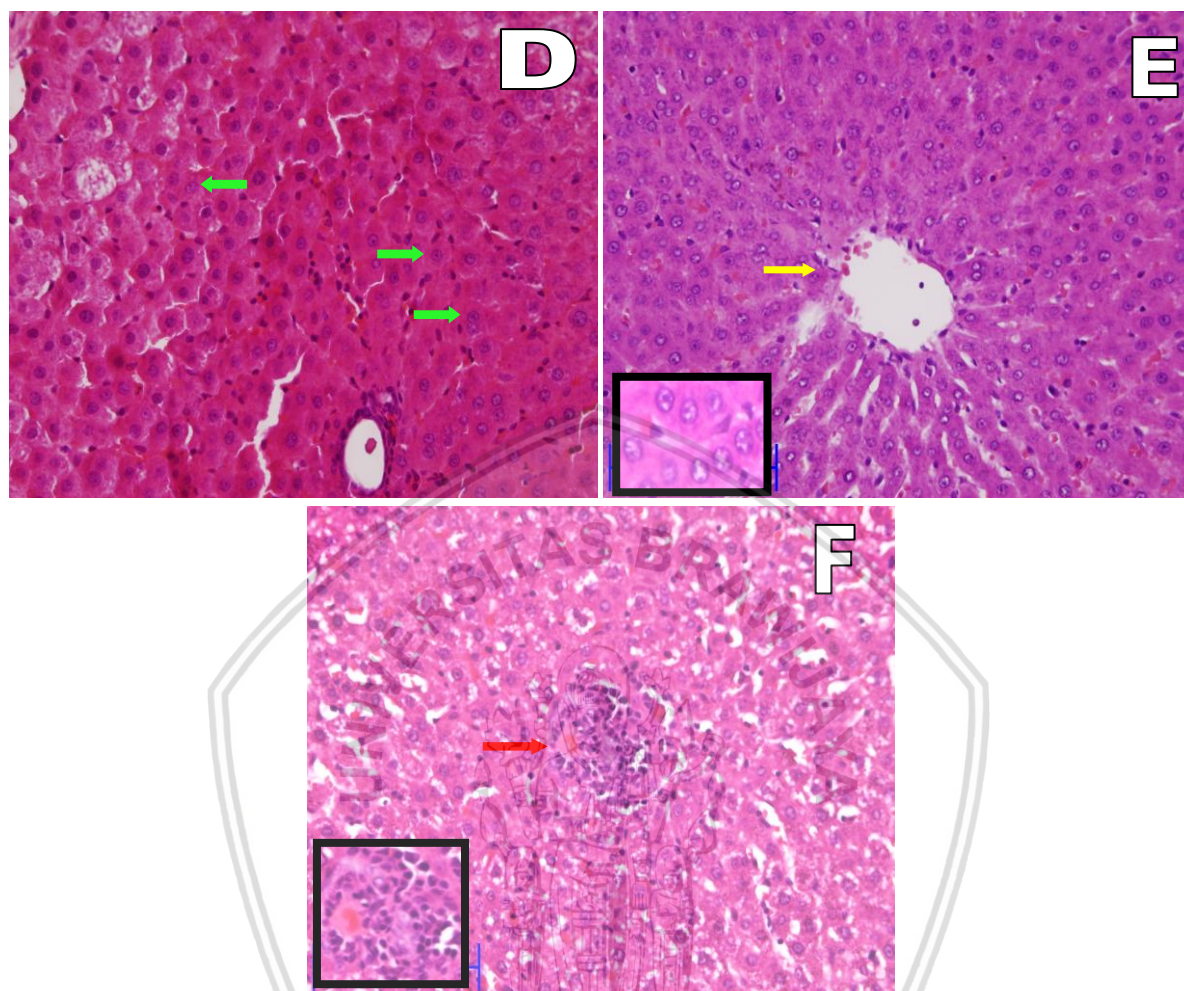




Gambar 5.2 Gambaran histopatologi hepar tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dengan pewarnaan HE perbesaran 400X

Keterangan: → : sel hepatosit hepar tikus jantan kontrol negatif
→ : sel hepatosit hepar tikus jantan terapi 14 hari
→ : sel hepatosit hepar tikus jantan terapi 28 hari
 : perbesaran 400X

(A) Histopatologi hepar tikus jantan pada kontrol negatif menunjukkan sel hepatosit normal. (B) Histopatologi hepar tikus jantan pada terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari menunjukkan sel hepatosit normal. (C) Histopatologi hepar tikus jantan pada terapi kombinasi kurkumin selama 28 hari terdapat akumulasi sel radang.



Gambar 5.3 Gambaran histopatologi hepar tikus (*Rattus norvegicus*) betina dengan pewarnaan HE perbesaran 400X

Keterangan: → : sel hepatosit hepar tikus betina kontrol negatif
→ : sel hepatosit hepar tikus betina terapi 14 hari
→ : sel hepatosit hepar tikus betina terapi 28 hari
 : perbesaran 400X

(D) Histopatologi hepar tikus betina pada kontrol negatif menunjukkan sel hepatosit normal. (E) Histopatologi hepar tikus betina pada terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari menunjukkan sel hepatosit normal. (F) Histopatologi hepar tikus jantan pada terapi kombinasi kurkumin selama 28 hari terdapat akumulasi sel radang.

Pengamatan terhadap histopatologi hepar tikus pada penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa tikus kontrol negatif menunjukkan gambaran histologi dalam keadaan normal yang meliputi sel hepatosit, vena sentralis, dan sinusoid dalam keadaan normal. Sel hepatosit terlihat inti berbentuk bulat dengan warna keunguan. Pada vena sentralis tidak terdapat limfosit. Sinusoid terlihat seperti celah beraturan, tidak melebar dan tidak pula menyempit.

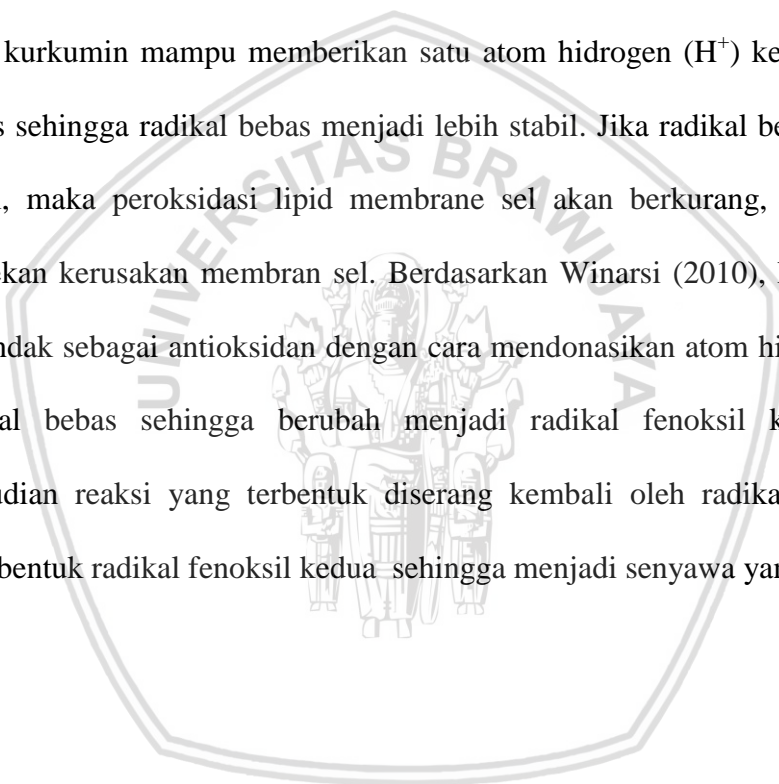
Menurut Lumongga (2008), gambaran histopatologi hepar secara normal terdiri dari bagian hepar yang disebut lobulus dimana dipisahkan oleh jaringan ikat dan pembuluh darah. Pembuluh darah pada hepar terdapat pada sudut-sudut lobulus, yang akhirnya membentuk bangunan yang disebut trigonum kiernan atau area portal. Pada area portal dapat ditemukan cabang arteri hepatica, cabang vena porta, dan duktus biliaris. Sel hepatosit terlihat berderet secara radier dalam lobulus hepar. Inti sel berbentuk bulat dan terletak di tengah, dengan pusatnya vena sentralis, dipisahkan oleh sebuah celah atau sinusoid hepar. Pada gambaran mikroskopik, di sinusoid hepar terdapat sel kupffer. Sel ini memiliki fungsi untuk memfagosit eritrosit tua, hemoglobin dan mensekresi sitokin selain itu dapat ditemukan juga sel-sel hepar atau yang biasa disebut hepatosit. Hepatosit berbentuk polyhedral dengan 6 permukaan atau lebih, memiliki batas yang jelas, dan memiliki inti yang bulat di tengah. Histopatologi hepar tikus kelompok terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 14 hari tidak menunjukkan adanya kerusakan sel hepatosit (Gambar 5.2 B dan 5.2 E). Kandungan kurkuminoid mampu meredam dampak negatif

dari oksidan dengan cara memberikan elektronnya pada oksidan. Antioksidan mampu mengubah oksidan menjadi molekul yang tidak berbahaya. Antioksidan juga mampu mencegah pembentukan radikal bebas sehingga kerusakan sel akibat radikal bebas juga berkurang (Tuminah, 2000).

Pada tikus kelompok terapi 28 hari (Gambar 5.2 C dan 5.2 F) ditemukan adanya perubahan pada gambaran histopatologi hepar tikus jantan dan betina yang diberi terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E selama 28 hari terjadi degenerasi hidropik. Pada degenerasi ini tampak vakuola yang berisi air dalam sitoplasma yang tidak mengandung lemak atau glikogen, sitoplasmanya menjadi pucat dan membengkak karena timbunan cairan. Menurut Rippey (2004), perubahan ini diakibatkan adanya gangguan metabolisme bahan kimia dari luar tubuh. Akumulasi bahan kimia dan metabolit yang berasal dari luar tubuh menyebabkan degenerasi sel. Pemberian terapi kurkumin dan vitamin E selama 28 hari menyebabkan gangguan pada organel mitokondria yang menghasilkan energi Adenosin Triposphat (ATP). Energi ATP tersebut dibutuhkan untuk berjalannya pompa natrium (Na^+). Apabila tidak ada ATP maka Na^+ yang ada dalam sel tidak akan keluar dari sel. Dimana Na^+ memiliki sifat menarik air. Sehingga menyebabkan terganggunya permeabilitas sel sehingga cairan yang ada di ekstrasel akan masuk ke dalam intrasel dalam jumlah yang banyak yang mengakibatkan terbentuknya vakuola yang jernih, kecil dan banyak. Vakuola-vakuola tersebut bersatu membentuk vakuola yang lebih besar atau vakuola tunggal yang menempati di dalam

sitoplasma dan menggantikan inti sel serta terjadi pembengkakan sel sehingga terjadilah degenerasi hidropik (Chang, 2006).

Keutuhan struktur dari hepatosit sangat penting untuk dipertahankan, karena hepatosit memiliki fungsi metabolisme dalam tubuh (Seef, 2011). Hal ini disebabkan karena ROS yang terdapat di dalam tubuh akan dinetralisir oleh berbagai antioksidan yang dikandung kurkumin. Kandungan kurkuminoid pada kurkumin mampu memberikan satu atom hidrogen (H^+) kepada radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi lebih stabil. Jika radikal bebas tersebut stabil, maka peroksidasi lipid membrane sel akan berkurang, dan mampu menekan kerusakan membran sel. Berdasarkan Winarsi (2010), kurkuminoid bertindak sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga berubah menjadi radikal fenoksil kurkuminoid, kemudian reaksi yang terbentuk diserang kembali oleh radikal bebas dan membentuk radikal fenoksil kedua sehingga menjadi senyawa yang stabil.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi kombinasi kurkumin selama 14 hari dengan dosis sebanyak 72 mg/kg BB pada tikus (*Rattus norvegicus*) merupakan dosis optimum yang mampu menurunkan kadar MDA pada tikus (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian terapi kombinasi kurkumin selama 14 hari dengan dosis sebanyak 72 mg/kg BB hepar tidak menimbulkan efek toksik terhadap hepar yang dibuktikan dengan keadaan sel hepatosit normal pada hasil gambaran histopatologi.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemberian terapi kombinasi kurkumin untuk mengetahui dosis terapi kurkumin yang tepat terhadap penyakit lainnya pada hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, B.B., Kumar, A., Aggarwal, M.S., and Shishodia, S. 2003. *Curcumin Derived From Turmeric (Curcuma longa): A Spice for All Seasons, in Phytochemicals in Cancer Chemoprevention*, CRC Press LLC, p. 1-24.
- Ahmada, R. 2014. Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosal Pudica*) Pada Tikus (*Rattus Norvergicus*) Model Asma Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Dan Gambaran Histopatologi Epitel Bronkiolus [Skripsi]. Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
- Amin, M.H.F, A.P.W. Marhendra, dan Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) Terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma*. Hal: 437-443.
- Amirkhizi, F., F Siassi, S. Minaie, M. Djalali, A. Rahimi, and M. Chamari. 2007. Is Obesity Associated With Increased Plasma Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Women. Iran: Nutrition and Biochemistry Dept. School of Public Health, Tehran University of Medical Science. *ARYA Atherosclerosis Journal*. 2(4): 182-192
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web. University of Michigan of Zoology.
- Arsana, I. N. 2014. Ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) Dan Pelatihan Fisik Menurunkan Stres Oksidatif Pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Selama Aktivitas Fisik Maksimal [Disertasi]. Program Studi Ilmu Kedokteran. Program Pascasarjana. Universitas Udayana
- Bintang, I.A.K & Nataatmaja, 2005. *Pengaruh penambahan tepung kunyit terhadap performan broiler, prosiding seminar nasional teknologi peternakan dan veteriner*. Bogor.
- Buckley DJ. 2005. *Influence of Dietary Vitamin E on The Oxidative Stability and Quality of Pig Meat*. *J. Anim. Sci.* (73): 3122-3130.
- Burt, A.D., B.C, Portmann., and L.D, Ferrel. 2007. *Pathology of the Liver* (Fifth Edition). New York: *Churchill Livingstone*.
- Cherwae, W., S. Anuchapreeda, K. Nandigama, S. V. Ambudkar, P. Limtrakul. 2004. Biochemical Mechanism of Modulation of Human P-glycoprotein (ABCBI) by Curcumin I, II and III Purified from Tumeric Powder, *Biochemical Pharmacology*; 68:2043-2052

- Dancygier, H. 2010. *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*. Berlin: Springer. 15-18, 208.
- Dellman HD & Brown E. 2002. *Buku Teks Histologi Veteriner II dan III*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Dewoto HR. 2007. *Vitamin dan Mineral. dalam Farmakologi dan Terapi edisi kelima*. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Percetakan Gaya Baru, Jakarta. p.769-92.
- Droge, W. 2002. Free Radicals in The Physiologi Control of Cell Function *Physiol. Rev* 82 47-95
- Ganong WF. 2003. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Jakarta.
- Grotto D., G.R Barcelos, J. Valentini, L.M. An-Tunes, J.P. Angeli, and S.C Garcia. 2009. Low Levels Of Methylmercury Induce DNA Damage In Rats: *Protective Effects Of Selenium. Arch Toxicol Journal* 83:249-5.
- Guyton and Hall. 2011. *Textbook of Medical Physiology, 12th edition*. Saunder Elsevier.
- Haliwell, B., and Gutteridge JMC., 2007, *Free Radical in Biology and Medicine 3rd Edition*, Oxford University Press, Oxford.
- Harahap, N. S. 2008. Pengaruh Aktivitas Fisik Maksimal terhadap Jumlah Leukosit dan Hitung Jenis Leukosit pada Mencit (*Mus musculus L*) Jantan [Tesis] Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Hodgson, E., and Levi. 2000. Target Organ Toxicity. In Textbook of Modern Toxicology. 2nd ed. *Boston. McGraw Hill*. pp102-247.
- Hoffman. 2004. *Progesterone Receptor Antagonists Prevent Carcinogen-Induce Cancer in Rats*, Experimental Oncology, Berlin.
- Junqueira L, J Carneiro, and O Kelley. 2007. *Histologi dasar, edisi ke-10*. Jakarta: EGC. hlm. 318-31.
- Kaplowitz. 2004. *Drug-induced liver injury. Clin Infect Dis*. 38(suppl2): S44-S48
- Kamiensky M, Keogh J. 2006. Vitamins and Minerals. In: *Pharmacology Demystified*. Mc.GrawHill Companies Inc., USA. p.137-54.
- Kelly WR. 2003. *The Liver and Billiary System. Di dalam : Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of Domestic Animals*. Academic Press. San Diego.

- Kumar, V., S.C. Ramzi dan R.L Stanly. 2007. *Robins Buku Ajar Patologi*. Volume 1. Edisi 7. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta. Hal. 35-64.
- Kumar, V., R.S, Cotran., dan S.L, Robbins. 2007. *Hati Dan Saluran Empedu*. Dalam: Hartanto H, Darmaniah N, Wulandari N, editor. Buku Ajar Patologi Robbins (Edisi Ketujuh). Jakrta: EGC, hal. 664-5.
- Kurnani, BA. 2001. *Radikal Bebas Dalam Polutan Lingkungan*. Seminar Nasional dan Lokakarya: Pemahaman Konsep Radikal Bebas Dalam Meningkatkan Kesehatan Menuju Indonesia Sehat 2010. Pusat Penelitian Kesehatan UNPAD Bandung
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Limantara, L. & P. Rahayu, 2008. *Sains dan Teknologi Pigmen Alami*, Prosiding sains dan Teknologi Pigmen Alami, Seminar Nasional Pigmen 2008 – Hotel Grand Wahid Salatiga, 5 September 2008.
- Lumongga F. 2008. Struktur Liver. *Journal Universitas Sumatera Utara Repository*. http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/2052/3/09E01_467.pdf.txt (17 November 2015).
- MacLachan NJ, Cullen JM. 2005. Liver, Billiary System and Exocrine Pankreas. Di dalam: Carlton MW, McGavin MD. Editor. *Thomson's Special Veterinary Pathology*. Ed ke-2. Mosby-Year Book Inc: Missouri hlm 91-93.
- Mangkoewidjojo, S. 2008. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis Indonesia*. University Press. Jakarta.
- Majithiya, J. B., A. N. Parmar, R. Balaraman, 2004. Effect of Curcumin on Triton WR 1339 Induced Hypercholestrolemia in Mice, *Indian J Pharmacol*; 36:381-384
- Marciniak, A., J. Brzeszczyńska, K. Gwoździński, and A. Jegier. 2009. Antioxidant Capacity and Physical Exercise. *Biology of Sport*. 26 (3):197-213
- Mardiany, TH. 2008. *Pengaruh Pemberian Timbal (Pb) Terhadap Kadar Malondialdehyde (Mda) Plasma Mencit* [Tesis]. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara :Medan.
- Mazumber, A., Rhagavan, K., Weinstein, J., Kohn, K. W., Pommer, Y. 2005. Inhibiton of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochem. Pharmacol*. 49, p.1165 – 1170.

- Mc Kee, T. and Mc Kee, J.R. 2003. *Aerobic Metabolism II: Elektron Transport And Oxidative Phosphorylation In: Biochemistry The Molecular Basis Of Life*. 3rd ed. McGraw-Hill, NY 10020. 319-326.
- Meiyanto E. 2000. Kurkumin Sebagai Obat Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksi. *Majalah Farmasi Indonesia* 10 (4): 224-236.
- Mudassir, Aziz, A., dan Punagi, A.Q. 2012. *Analisis Kadar Malondialdehida (Mda) Plasma Penderita Polip Hidung Berdasarkan Dominasi Sel Inflamasi Pada Pemeriksaan Histopatologi*. Makasar: Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.
- Nagareddy P.R., P.S. Rajput, H. Vasudevan, B. McClure, U. Kumar, K.M. Macleod, and J.H. McNeill. 2012. Inhibition Of Matrix Metalloproteinase-2 Improves Endothelial Function and Prevents Hypertension In Insulin-Resistant Rats. *British journal of pharmacology*. 165(3):705- 715.
- Papay JI, Clines D, Rafi R dan Yuen N. 2009. Drug-induced liver injury following positive drug rechallenge. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54, 84–90.
- Pebriana, R.B., et al. 2008. Docking Kurkumin dan Senyawa Analognya pada Reseptor Progesteron: Studi Interaksinya Sebagai Selective Progesterone Receptor Modulators (SPRMs). *PHARMACON*, Vol. 9, No. 1, juni 2008, 14-20
- Pham-Huy, L. A. P., H. He and C. Pham-Huy. 2008. Free radicals, antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4:89-96.
- Rusmiati dan A. Lestari. 2004. *Struktur histologis organ hepar dan ren mencit (MusMusculus L) jantan setelah perlakuan dengan ekstrak kayu secang (Caesalpinia sappan L)*. Vol 1. No 1. Hlm 23-30.
- Ridwan, E. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/ Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta. *J Indon Med Assoc*, Volum: 63, Nomor: 3, Maret 2013
- Rukmanasari, R. 2010. Efek Ekstrak Kulit Terong Ungu (*Solanum melongena* L.) Terhadap Kadar LDL Dan HDL Darah Tikus Putih [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret.
- Rogers, A.B., Dintzis, R.Z. 2012. *Liver and Gallblader*. Di dalam: Treuting PM, Dintzis SM, editor. *Comparative Anatomy and Histology*. USA: Elsevier. Hlm 193-201.
- Sardjiman. 2000. *Synthesis of Some New Series of Curcumin Analogues, Antioxydative, Antiinflammatory, Antibacterial Activities, and Qualitative – Structure Activity Relationships*, Dissertation, Gadjah Mada University, Yogyakarta.

- Seef L.B., and R.J Fontana. 2011. *Drug-Induced Liver Injury*. In : *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*. Editors: James S D, Anna S F, Lok A K B E, Jenny H. UK: Blackwell Publishing Ltd. 11: 478-506.
- Snell, RS. 2006. *Anatomi Klinik untuk Mahasiswa Kedokteran*. Ed. 6. ECG: Jakarta.
- Somasundaram, Edmund, N.A., Moore, Small, Shi, Orlowski. 2003. *Dietary Curcumin Inhibits Chemoterapy-Induced Apoptosis in Models Of Human Breast Cancer*. Diakses dari www.ncbi.nlm.nih.gov 2016
- South EH, Exon JH and Hendrix K. 2007. Dietary curcumin enchances antibody response in rat, *immunopharmacol Immunotoxicol*. 19,105-119.
- Sudibyo, RS., Gunawan, D. 2005. *Curcumin Pharmacochemistry*, Proceeding of the International symposium on curcumin pharmacochemistry (ISCP), Aditya Media Yogyakarta.
- Sun, You-Min, Zhang, Hong-Yu, Chen, De-Chan and Liu, Cheng-Bu. 2002. *Theoritical Elucidation on the Antioxidant Mechanism of Curcumin : A DFT Study*. Shandong University, Jinan.
- Sutari, V.T., Sugito, D Aliza, dan Asmarida. 2013. Kadar Malondialdeheid (MDA) Pada Jaringan Hati Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Diberi Cekaman Panas Dan Pakan Suplementasi Tepung Daun Jaloh (*Salix tetrasperma Roxb*). *Jurnal Medika Veterinaria*. 7(1):35-36
- Suwandi, T. 2012. *Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosela Menurunkan Malondialdhida Pada Tikus Yang diberi Minyak Jelantah* [Tesis]. Program Magister. Program Studi Ilmu Biomedik. Program Pascasarjana. Universitas Udayana. Denpasar.
- Talley NJ, MT Abreu, JP Achkar, CN Bernstein, MC Dubinsky, SB Hanauer, SV Kane, WJ Sandborn, TA Ulman and P Moayyedi. 2011. An Evidence –Based Systemic Reviewon Medical Therapies for Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* ; 106:S2-S25.
- Tuminah, S. 2000. *Radikal Bebas dan Antioksidan Kaitannya dengan Nutrisi dan Penyakit Kronis*. Pusat Penelitian Penyakit Tidak Menular ; Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI : Jakarta.
- Varalkhsmi, Ch., A. Mubarak Ali., and B.V.V. Pardhasaradhi. 2008. Immunomodulatory Effect of Curcumin: In Vivo. *Int. J. Imm.* 8:688
- Wenas N. T. 2000. *Kelainan Hati Akibat Obat*. Dalam : Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I Edisi III. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. Pp : 364
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius.Yogyakarta..

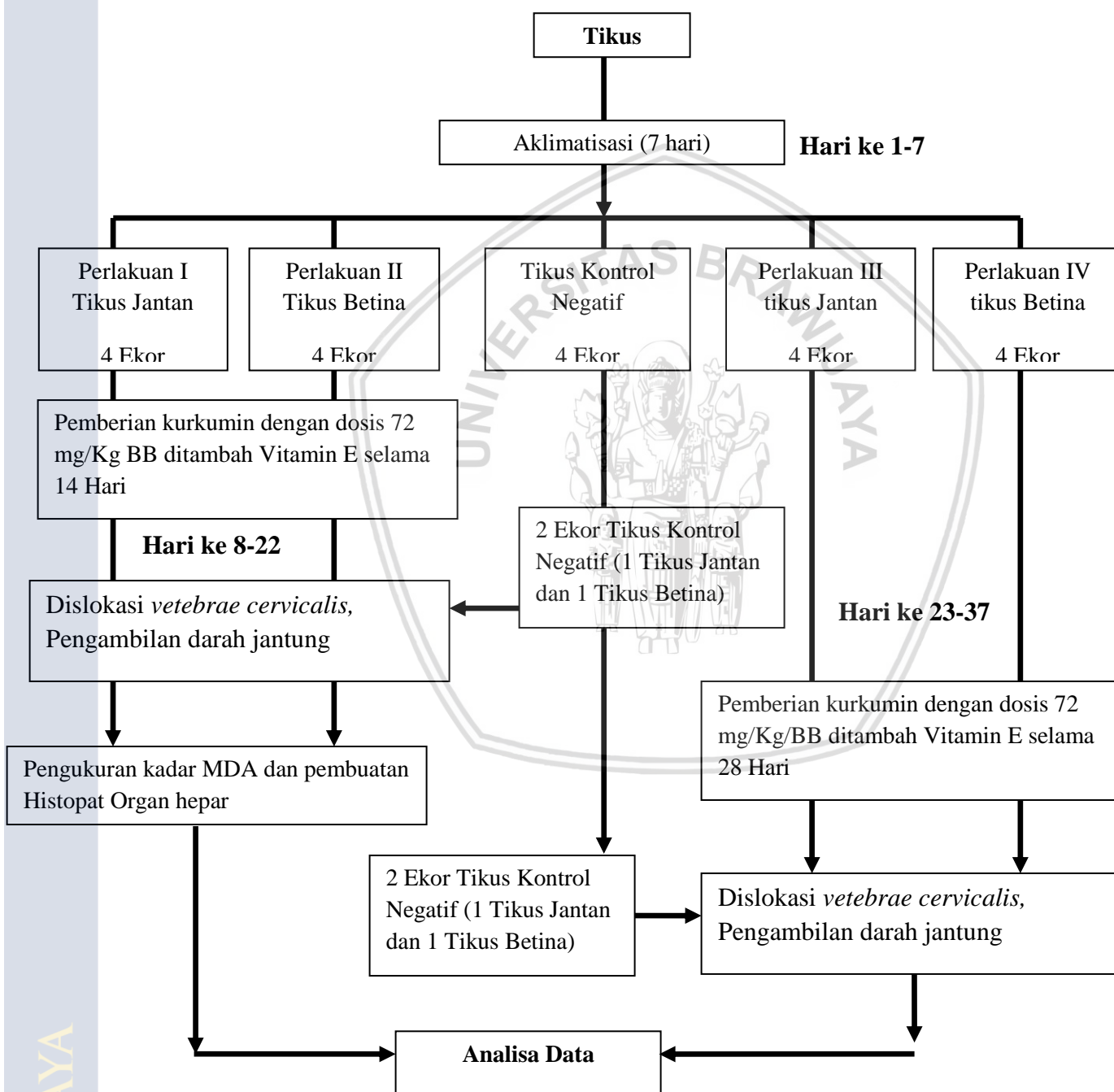
Wulandari, D. 2012. *Kadar Malondialdehida (MDA) Dan Histopatologi Organ Hati Pada Hewan Model Tikus (Rattus Norvegicus) Hiperkolesterolemia Setelah Terapi Ekstrak Air Benalu Mangga (Dendrophthoe Pentandra L. Miq).* Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Malang

Yuniastuti. 2008. *Gizi dan Kesehatan.* Graha Ilmu: Yogyakarta.

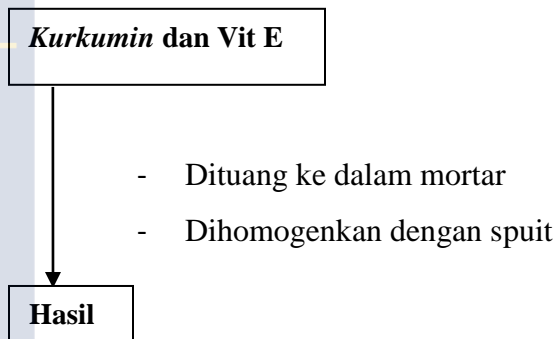


LAMPIRAN

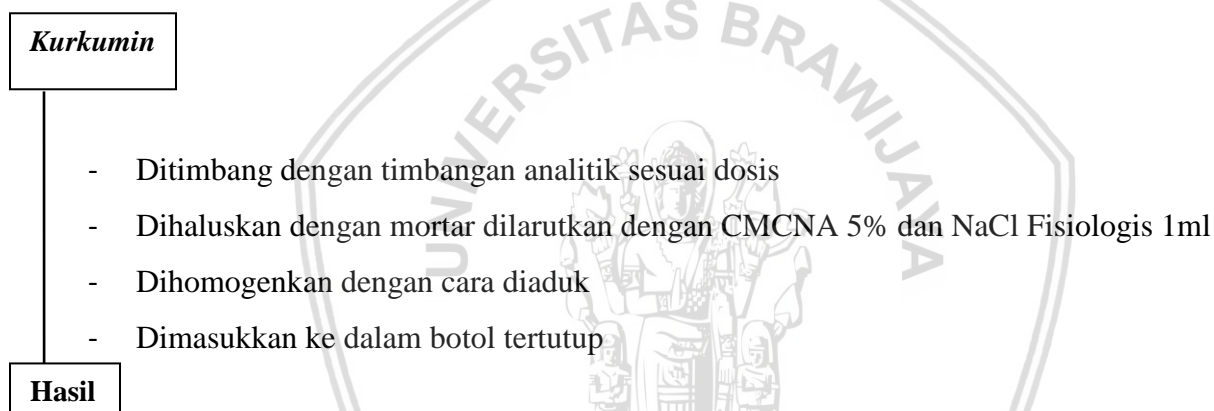
Lampiran 1. Kerangka Operasional



Lampiran 2. Pembuatan Larutan Kombinasi Kurkumin dengan Vitamin E



Lampiran 3. Pembuatan Larutan Kurkumin



Lampiran 4. Pembuatan Pelarut Kurkumin

CMCNA 5% +NaCl Fisiologis = 1 ml/ekor/hari

Untuk 5 ekor = 5 ml/hari

Untuk 7 hari = $5 \text{ ml} \times 7 = 35 \text{ ml}$

= $5/100 \times 35 \text{ ml}$

= 1,75 mg

Pelarut CMCNA 5% diberikan sebanyak 1,75 mg /minggu pada masing-masing kelompok perlakuan terapi.

Lampiran 5. Dosis Kurkumin Setiap Tikus

Rata –rata berat tikus = 183 mg

Dosis kurkumin yang digunakan = 72 mg/kg BB

Dosis perekor = BB Tikus/ 1000 gram \times 72 mg

= 183 gram / 1000 gram \times 72 mg

= 13, 17 mg/ ekor

Lampiran 6. Prosedur Perhitungan Kadar MDA

Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum MDA

100 μ l Stok Kit MDA konsentrasi
1,2,3,4,5,6,7 dan 8 mg/ml

- Dimasukkan dalam tabung reaksi kecil
- Ditambah 550 μ l akuades
- Ditambahkan 100 μ l TCA 10% dan dihomogenkan
- Ditambahkan 250 μ l HCl dihomogenkan
- Ditambahkan 100 μ l Na-Thio 1 % dan dihomogenkan
- Disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit

Supernatan

- Diinkubasi pada water bath 100⁰C selama 30 menit
- Diangkat dan dibiarkan dalam suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 533nm

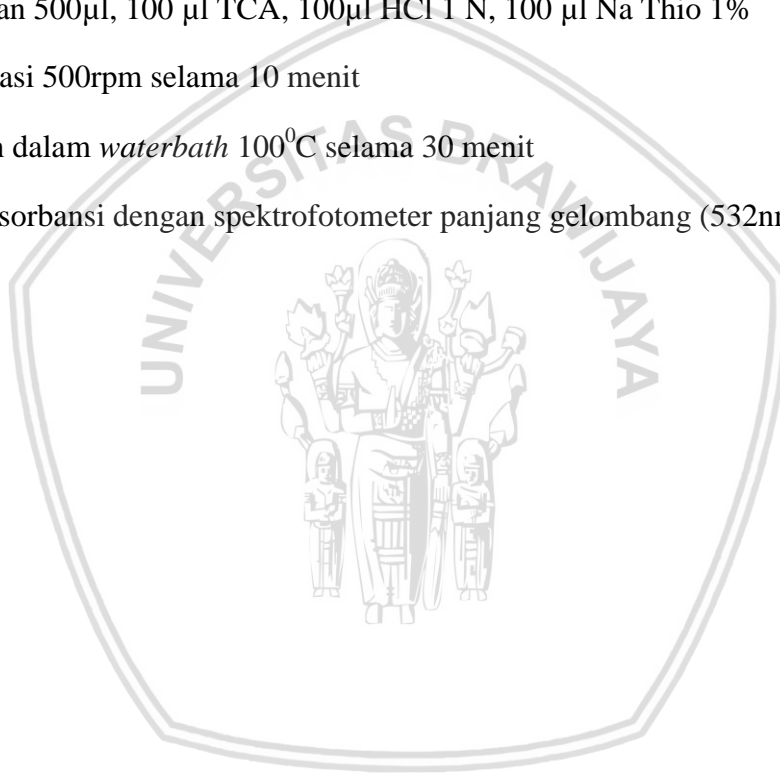
Absorbansi Larutan Standard Kurva Standar MDA

Pengukuran Kadar MDA pada organ Hepar

Organ Hepar Seberat 1 Gram

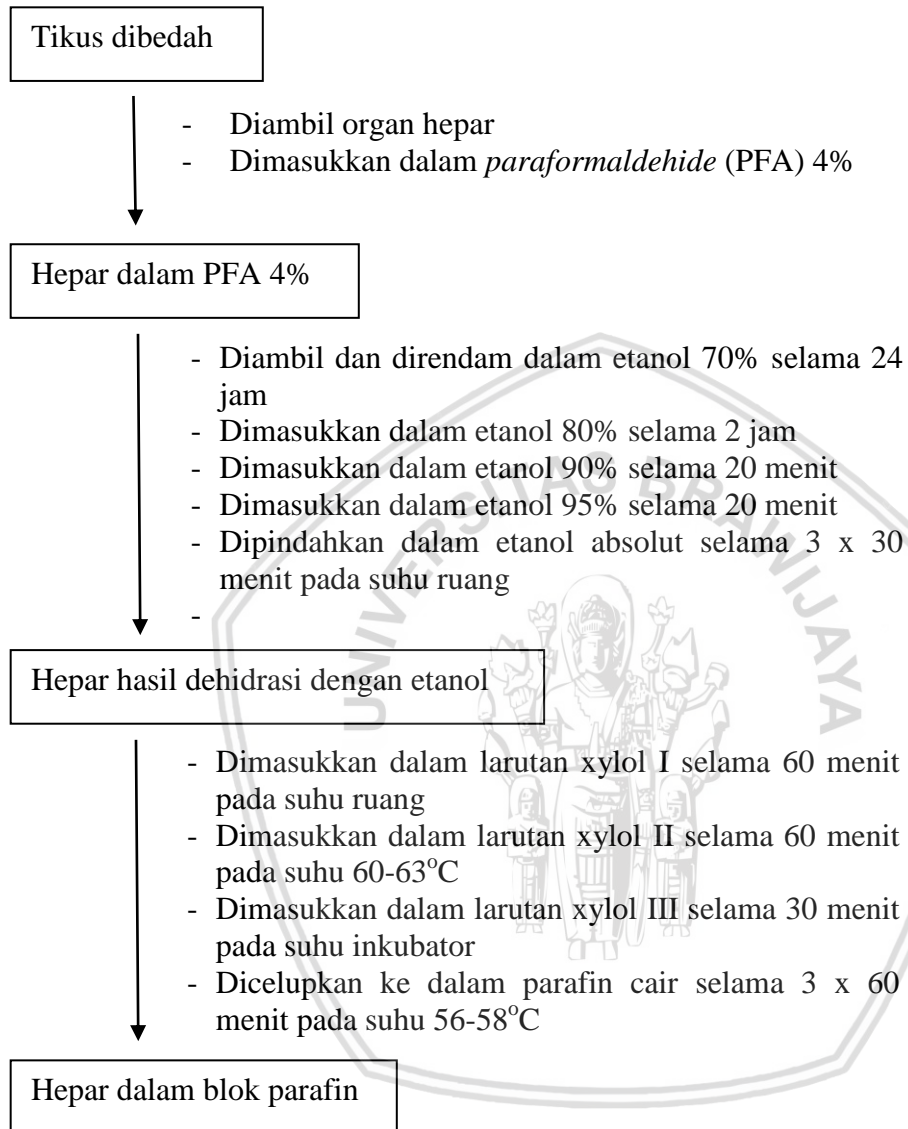
- Dimasukkan kedalam mortar dan digerus halus
- Ditambahkan 500 μ l NaCl 0,9% dan dihomogenisasi
- Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8000rpm selama 20 menit
- Diambil 100 μ l supernatan
- Ditambahkan 500 μ l, 100 μ l TCA, 100 μ l HCl 1 N, 100 μ l Na Thio 1%
- Disentrifugasi 500rpm selama 10 menit
- Dipanaskan dalam *waterbath* 100⁰C selama 30 menit
- Dikukur absorbansi dengan spektrofotometer panjang gelombang (532nm)

HASIL

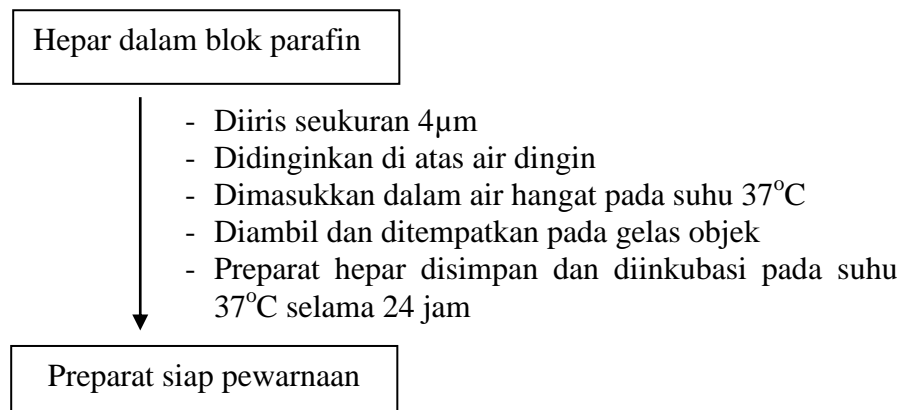


Lampiran 7. Pembuatan Preparat Histologi

Pengambilan Sampel



Pembuatan Preparat Organ Hepar



Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Preparat Hepar

- Dideparafinasi dengan xylol selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol absolut selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 menit
- Dicuci dengan menggunakan air mengalir selama 15 menit
- Direndam dalam akuades steril selama 5 menit

Preparat Hepar

- Diwarnai dengan Hematoksilin selama 10 menit
- Dicuci dengan menggunakan air mengalir selama 30 menit
- Dibilas dan direndam dengan akuades selama 5 menit
- Diwarnai dengan menggunakan Eosin selama 5 menit
- Dicuci kembali dengan menggunakan air mengalir selama 10 menit
- Dibilas dengan akuades selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol absolut 3 x 2 menit
- Dimasukkan dalam larutan xylol 3 x 3 menit
- Dikering anginkan dan ditutup dengan *cover glass*
- *Dimounting* dengan menggunakan antellan
- Ditutup dengan *cover glass*

Preparat Hepar

Lampiran 8. Perhitungan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Hepar Tikus Jantan

Kadar MDA (*Malondialdehyde*) dapat diketahui dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA (Gambar kurva MDA) $y = 0,0004x - 0,0126$. Dimana kadar MDA sebagai nilai x . Misalnya salah satu kelompok negatif memiliki nilai absorbansi 0,481. Maka dapat dihitung kadar MDA dengan persamaan kurva standar MDA.

Contoh perhitungan kadar *malondialdehyde* (MDA) adalah

$$y = 0,0004x - 0,0126$$

$$0,481 = 0,0004x - 0,0126$$

$$x = (0,481 + 0,0126) / 0,0004$$

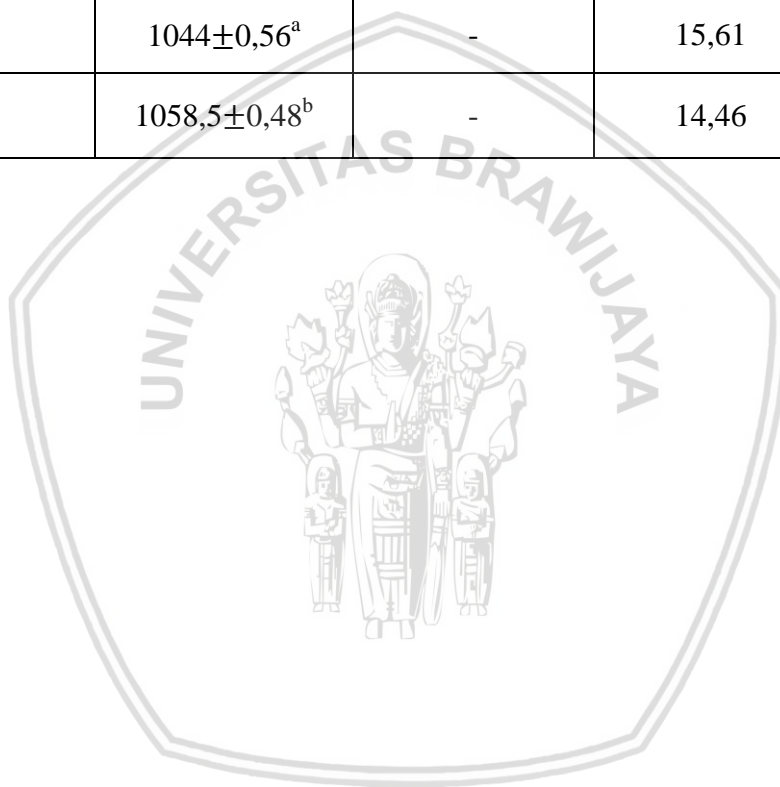
$$x = 1234 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

Tabel L.8.1 Data absorbansi dan konsentrasi *malondialdehyde* (MDA) hepar

Kelompok	Tikus	Absorbansi	Kadar MDA ($\mu\text{g/mL}$)
Kontrol Negatif 2 minggu	1	0,481	1234
	2	0,485	1236
	3	0,492	1240
	4	0,489	1239
Rata-rata			1237,25
Kontrol Negatif 4 minggu	1	0,618	1576
	2	0,621	1577
	3	0,610	1569
	4	0,612	1570
Rata-rata			1573
Kontrol positif 2 minggu	1	0,408	1051
	2	0,391	1040
	3	0,395	1043
	4	0,394	1042
Rata-rata			1044
Kontrol positif 4 minggu	1	0,409	1054
	2	0,412	1058
	3	0,416	1060
	4	0,419	1062
Rata-rata			1058,5

Tabel.L.8.2 Perhitungan peningkatan atau penurunan kadar *malondialdehyde* (MDA) hepar tikus (*Rattus norvegicus*) jantan

Perlakuan	MDA ($\mu\text{g/mL}$)	MDA (%)	
		Peningkatan dari kontrol negatif 1 minggu	Penurunan dari kontrol negative 1 minggu
Kontrol negatif 2 minggu	$1237,25 \pm 0,81^c$	-	-
Kontrol negatif 4 minggu	$1573 \pm 0,09^d$	27,1	-
Kontrol positif 2 minggu	$1044 \pm 0,56^a$	-	15,61
Kontrol positif 4 minggu	$1058,5 \pm 0,48^b$	-	14,46



Lampiran 9. Perhitungan Peningkatan dan Penurunan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) hepar tikus (*Rattus norvegicus*) dapat meningkatkan MDA dan terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E dapat menurunkan MDA tikus jantan. Prosentase peningkatan dan penurunan dapat dihitung sebagai berikut :

1. Peningkatan Rata-rata Kadar MDA Kelompok Kontrol Negatif 4 minggu

$$\begin{aligned}\% \text{ Peningkatan} &= \frac{(\text{Kadar MDA N2} - \text{Kadar MDA N1})}{\text{Kadar MDA N1}} \times 100\% \\ &= \frac{(1573 - 1237,25)}{1237,25} \times 100\% \\ &= 27,1 \%\end{aligned}$$

2. Penurunan Rata-rata Kadar MDA Kontrol Positif 4 Minggu

$$\begin{aligned}\% \text{ Penurunan} &= \frac{(\text{Kadar MDA N1} - \text{Kadar MDA P2})}{\text{Kadar MDA N1}} \times 100\% \\ &= \frac{(1237,25 - 1058,5)}{1237,25} \times 100\% \\ &= 14,46 \%\end{aligned}$$

3. Penurunan Rata-rata Kadar MDA Kontrol Positif 2 Minggu

$$\begin{aligned}\% \text{ Penurunan} &= \frac{(\text{Kadar MDA N1} - \text{Kadar MDA P1})}{\text{Kadar MDA N1}} \times 100\% \\ &= \frac{(1237,25 - 1044)}{1237,25} \times 100\% \\ &= 15,61\%\end{aligned}$$

Lampiran 10. Perhitungan Statistika Kadar Malondialdehyde (MDA) Hepar Tikus Jantan**Test of Homogeneity of Variances**

jantan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.601	3	12	.626

ANOVA

jantan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	726786.688	3	242262.229	16355.256	.000
Within Groups	177.750	12	14.813		
Total	726964.438	15			

JantanTukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
kontrol positif 2 minggu	4	1044.00			
kontrol positif 4 minggu	4		1058.50		
kontrol negatif 2 minggu	4			1237.25	
kontrol negatif 4 minggu	4				1573.00
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Lampiran 11. Perhitungan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Hepar Tikus Betina

Kadar MDA (*Malondialdehyde*) dapat diketahui dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA (Gambar kurva MDA) $y = 0,0004x - 0,0126$. Dimana kadar MDA sebagai nilai x . Misalnya salah satu kelompok negatif memiliki nilai absorbansi 0,413. Maka dapat dihitung kadar MDA dengan persamaan kurva standar MDA.

Contoh perhitungan kadar *malondialdehyde* (MDA) adalah

$$y = 0,0004x - 0,0126$$

$$0,413 = 0,0004x - 0,0126$$

$$x = (0,413 + 0,0126) / 0,0004$$

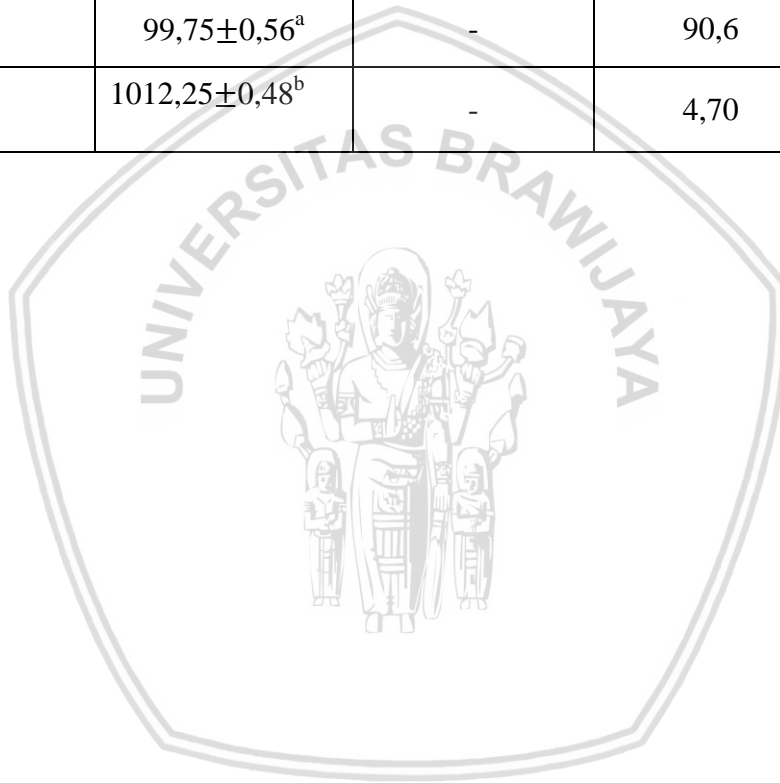
$$x = 1064 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

Tabel L.11.1 Data absorbansi dan konsentrasi *malondialdehyde* (MDA) hepar

Kelompok	Tikus	Absorbansi	Kadar MDA ($\mu\text{g/mL}$)
Kontrol Negatif 2 minggu	1	0,413	1064
	2	0,409	1060
	3	0,407	1058
	4	0,418	1067
Rata-rata			1062,25
Kontrol Negatif 4 minggu	1	0,452	1162
	2	0,455	1165
	3	0,458	1167
	4	0,461	1171
Rata-rata			1166,25
Kontrol positif 2 minggu	1	0,383	989
	2	0,392	1010
	3	0,385	990
	4	0,389	998
Rata-rata			99,75
Kontrol positif 4 minggu	1	0,389	1004
	2	0,407	1020
	3	0,403	1018
	4	0,390	1007
Rata-rata			1012,25

Tabel.L.11.2 Perhitungan peningkatan atau penurunan kadar *malondialdehyde* (MDA) hepar tikus (*Rattus norvegicus*) betina

Perlakuan	MDA ($\mu\text{g/mL}$)	MDA (%)	
		Peningkatan dari kontrol negatif 1 minggu	Penurunan dari kontrol negative 1 minggu
Kontrol negatif 2 minggu	$1062,25 \pm 0,81^c$	-	-
Kontrol negatif 4 minggu	$1166,25 \pm 0,09^d$	9,79	-
Kontrol positif 2 minggu	$99,75 \pm 0,56^a$	-	90,6
Kontrol positif 4 minggu	$1012,25 \pm 0,48^b$	-	4,70



Lampiran 12. Perhitungan Peningkatan dan Penurunan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) hepar tikus (*Rattus norvegicus*) dapat meningkatkan MDA dan terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E dapat menurunkan MDA tikus betina. Prosentase peningkatan dan penurunan dapat dihitung sebagai berikut :

4. Peningkatan Rata-rata Kadar MDA Kelompok Kontrol Negatif 4 minggu

$$\begin{aligned}\% \text{ Peningkatan} &= \frac{(\text{Kadar MDA N2} - \text{Kadar MDA N1})}{\text{Kadar MDA N1}} \times 100\% \\ &= \frac{(1166,25 - 1062,25)}{1062,25} \times 100\% \\ &= 9,79 \%\end{aligned}$$

5. Penurunan Rata-rata Kadar MDA Kontrol Positif 4 Minggu

$$\begin{aligned}\% \text{ Penurunan} &= \frac{(\text{Kadar MDA N1} - \text{Kadar MDA P2})}{\text{Kadar MDA N1}} \times 100\% \\ &= \frac{(1062,25 - 1012,25)}{1062,25} \times 100\% \\ &= 4,70 \%\end{aligned}$$

6. Penurunan Rata-rata Kadar MDA Kontrol Positif 2 Minggu

$$\begin{aligned}\% \text{ Penurunan} &= \frac{(\text{Kadar MDA N1} - \text{Kadar MDA P1})}{\text{Kadar MDA N1}} \times 100\% \\ &= \frac{(1062,25 - 99,75)}{1062,25} \times 100\% \\ &= 90,6\%\end{aligned}$$

Lampiran 13. Perhitungan Statistika Kadar Malondialdehyde (MDA) Hepar Tikus Betina**Test of Homogeneity of Variances**

betina

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.653	3	12	.096

ANOVA

betina

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	70292.750	3	23430.917	499.416	.000
Within Groups	563.000	12	46.917		
Total	70855.750	15			

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
kontrol positif 2 minggu	4	996.75			
kontrol positif 4 minggu	4		1012.25		
kontrol negatif 2 minggu	4			1062.25	
kontrol negatif 4 minggu	4				1166.25
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.